

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-161384

(43)Date of publication of application : 19.06.2001

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566
// C07K 14/715
C07K 16/28
C12P 21/08

(21)Application number : 2000-308650

(71)Applicant : NATL INST OF ADVANCED INDUSTRIAL
SCIENCE & TECHNOLOGY METI

(22)Date of filing : 16.11.1998

(72)Inventor : TANAKA MANAMI
TANAKA ASAO

(54) METHOD FOR DETECTING CARCINOMA

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To utilize a protein bearing an important role on the long term survival of the cranial nerves cell and a DNA encoding the protein on the detection of carcinoma.

SOLUTION: The detection of carcinoma, e.g. large bowel carcinoma, skin carcinoma or the like, is carried out by using the DNA encoding the bradion protein or its analogue derived from human beings and the antibody immunoreactive with the protein or its analogue.

Case No.	Age (yr)	Misc. type	Protein	K-ras	Bradyon	Immunoreactive
11	51/M	Ad(met)	A	-	ND	+
12	51/F	Ad(met)	B	-	ND	+
13	71/M	Ad(met)	C	-	ND	+
14	50/M	Ad(met)	C	-	ND	+
15	41/M	Ad(met)	C	-	ND	+
16	75/M	Ad(met)	A	-	ND	+
17	71/F	Ad(wet)	B	GTT	ND	+
18	56/M	Ad(wet)	B	-	ND	+
19	70/F	Ad(wet)	C	GGT	ND	+
110	54/M	Ad(wet)	C	GAT	ND	+
111	73/F	Met	A	-	ND	+
113	63/M	Met	A	-	ND	+
115	68/F	Met	C	GAT	ND	+
K1	54/M	normal	-	-	-	-
K2	51/M	normal	-	-	-	-

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.10.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3292867

[Date of registration] 05.04.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-161384

(P2001-161384A)

(43) 公開日 平成13年6月19日 (2001.6.19)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53			M
		33/566	
33/566		C 0 7 K 14/715	
	審査請求 有	請求項の数 3	OL (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-308650 (P2000-308650)
 (62) 分割の表示 特願平10-325380の分割
 (22) 出願日 平成10年11月16日 (1998. 11. 16)

(71) 出願人 301000011
 経済産業省産業技術総合研究所長
 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
 (72) 発明者 田中 真奈実
 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
 院 生命工学工業技術研究所内
 (72) 発明者 田中 朝雄
 神奈川県伊勢原市上粕屋246 東海大学職
 員住宅401号

(54) 【発明の名称】 癌の検出法

(57) 【要約】

【課題】 脳神経細胞の長期生存に大きな役割を担っている蛋白質及びそれをコードするDNAの、癌の検出への利用。

【解決手段】 ヒト由来ブラディオン (Bradeion) 蛋白質又はその類似体をコードするDNAおよび該蛋白質又はその類似体と免疫反応性である抗体の、大腸癌及び皮膚癌などの癌の検出における使用方法。

Case No.	Age/sex	Hist. type	Dukes' stage	K-ras (codon 12)	Bradelon RT-PCR	In situ hybridization
T1	81/M	Ad(mod)	A	-	ND	+
T2	51/F	Ad(mod)	B	-	ND	+
T3	71/M	Ad(mod)	C	-	++	+
T4	70/M	Ad(mod)	C	-	ND	+
T5	40/M	Ad(mod)	C	-	ND	+
T6	75/M	Ad(mod)	A	-	ND	+
T7	71/F	Ad(well)	B	GTT	++	+
T8	56/M	Ad(well)	B	-	ND	+
T9	70/F	Ad(well)	C	GGT	++	+
T10	54/M	Ad(well)	C	GAT	ND	+
T11	73/F	MM	A	-	ND	+
T12	63/M	Muc	A	-	++	+
T13	68/F	Muc	C	GAT	++	+
N1	54/M	normal	-	-	-	-
N2	81/M	normal	-	-	-	-

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 癌の検出における、下記の DNA もしくはその断片、または抗体の使用する方法：

(1) 配列番号 2 もしくは配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有するヒト由来ブラディオン蛋白質をコードする DNA、または 15 個以上の連続するスクレオチドの配列からなるその断片、

(2) 配列番号 2 または配列番号 4 に示すアミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し且つ以下の性質：

(a) 膜蛋白質である、

(b) K y t e - D o o l i t t l e 法によるヒドロパシー分析により、膜貫通部分（一回）も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有する、

(c) ヒト成人脳に強度の発現が認められ、心臓において脳の 10% 以下の発現が認められ、その他の臓器やヒト胎児には発現されない、

(d) 未分化のヒト培養神経細胞に過剰発現させると、細胞死を誘導する、

(e) 培養ヒト正常細胞に過剰発現させると、老化・分裂停止を誘導する、

(f) 細胞死に至る過程で細胞質に存在して細胞内凝集体を形成し、24 時間以内にミトコンドリアに集積する、及び

(g) ヒト大腸癌細胞株又は皮膚癌細胞株で特異的に発現される、を有する DNA 組換え技術により得ることができるヒト由来ブラディオン蛋白質類似体をコードする DNA、または 15 個以上の連続するスクレオチドの配列からなるその断片、

(3) 配列番号 1 に示す 1 2 9 位～1 9 4 3 位の塩基配列からなる DNA もしくはそれとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA、または 1 5 個以上の連続するスクレオチドの配列からなるそれらの断片、

(4) 配列番号 3 に示す 1 2 9 位～1 5 6 2 位の塩基配列からなる DNA もしくはそれとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA、または 1 5 個以上の連続するスクレオチドの配列からなるそれらの断片、

(5) 寄託微生物 FERM BP-6922 中に含まれるブラディオンをコードする DNA、または 15 個以上の連続するスクレオチドの配列からなるその断片、あるいは、

(6) 上記 (1) ～ (5) のいずれかに記載の DNA またはその断片によってコードされるヒト由来ブラディオン蛋白質、その類似体、またはそれらの断片に対する抗体。

【請求項 2】 前記癌がヒト大腸癌またはヒト皮膚癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記検出がハイブリダイゼーションまたはイムノアッセイによって行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、脳神経細胞の長期生存に係わる蛋白質をコードする DNA 及び該蛋白質に対する抗体の、癌の検出における使用方法に関する。具体的には、本発明は、ヒト由来ブラディオン (B r a d e i o n) 蛋白質又はその類似体をコードする DNA および該蛋白質又はその誘導体と免疫反応性である抗体の、癌の検出における使用方法に関する。

【0002】

10 【従来の技術】 脳神経細胞 (ニューロン) は、高等生物個体の生存を司る主要素子であり、生まれてからは一切分裂せず、刻々脱落・壊死していくのみである。このニューロンの脱落は、正常状態でも起こるが、遺伝病・脳虚血やてんかん重積状態、低栄養・低酸素条件で非常に加速させる。老化に伴う脳神経障害 (ほけ等) は、これらの集積による機能性ニューロンの絶対量の不足によるものであり、この脱落状態のモニタリング、脱落制御、ひいてはニューロンの機能再生が高齢化におけるもっとも緊急な課題であると考えられる。

20 【0003】 脳神経細胞は、発生過程における分化誘導期を過ぎると、その後分裂せず、個体寿命が尽きるまでその機能を維持したまま (あるいは緩やかな機能減退とともに) 生存し、特異な分裂停止機構及び機能維持機構が存在すると推測されるが、未だその機構解明に至っていない。中枢神経系は、未解明の蛋白質・シグナル伝達物質 (刺激物質としても受容体としても) の宝庫であり、現在解明を待つ物質が大量に存在する。特に、脳と特異的なシグナル伝達に係わる刺激物質、その受容体が多数存在し、その全貌は未だ明らかになっていない。

30 【0004】 このように重要な脳神経細胞の生存制御因子に対して、多数の研究が世界レベルで展開されたが、未だその本体の物質的・分子的解明に至っておらず、解析技法の開発から着手されなくてはならなかった。最近、米国テキサス大学のハワードヒューズ財団認定医学研究所の柳沢正史博士らのグループが、このような神経ペプチドとその受容体を培養細胞を用いて無作為に探索する技術開発に成功し、その例として視床下部の食欲刺激中枢に直接結合・刺激する物質 (オレキシン) の発見とその受容体の機能解明に成功した (C e l l , 9 2 , 5 7 3 - 5 8 5 (1 9 9 8)) 。しかし、このような系統だった物質探索の試みはまれであり、脳特異的なシグナル伝達に係わる刺激物質、その受容体の解明については未だ十分に行われていないのが現状であった。このような状況にあって、本発明者は、改良型発現遺伝子 (c DNA) ライブラリーの構築、系統的スクリーニング技術を開発し、それにより脳神経細胞特異的な遺伝子の抽出・選別に成功し、本発明を完成した。

【0005】

50 【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、脳神経細胞の長期生存に関与するブラディオン蛋白質をコー

トするDNA又は該蛋白質に対する抗体を癌の検出に使用することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、以下の性質：

(1) 膜蛋白質である、(2) K y t e - D o o l i t t l e 法によるヒドロパシー分析により、膜貫通部分(一回)も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有する、(3) ヒト成人脳に強度の発現が認められ、心臓において脳の10%以下の発現が認められ、その他の臓器やヒト胎児には発現されない、(4) 未分化のヒト培養神経細胞に過剰発現させると、細胞死を誘導する、(5) 培養ヒト正常細胞に過剰発現させると、老化・分裂停止を誘導する、(6) 細胞死に至る過程で細胞質に存在して細胞内凝集体を形成し、24時間以内にミトコンドリアに集積する、及び(7) ヒト大腸癌細胞株及びヒト皮膚癌細胞株で特異的に発現されるを有するヒト由来のブラディオオン蛋白質又はその類似体に関する。

【0007】本発明の蛋白質には、配列表の配列番号2又は4に示すアミノ酸配列からなり、それぞれ α ブラディオオン、 β ブラディオオンと称する蛋白質が包含される。これらの蛋白質は転写過程での選択的スプライシングによる発現産物であると考えられる。上記の性質に加えて、 α ブラディオオンの場合、培養癌細胞に α ブラディオオン又はその類似体をコードするDNAを遺伝子導入すると細胞死を誘発するという性質を示すが、これに反して β ブラディオオンの場合そのような細胞死は観察されない。

【0008】本明細書中「類似体」とは、ヒト由来ブラディオオンと実質的に同等の性質、特に上記性質中少なくとも(1)、(2)、(3)、(6)、(7)の性質をもつもの、或いは、配列番号2又は4に示すアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものである。類似体は、配列番号2又は4に示すアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上の相同性を有するのが望ましい。本発明の類似体には、ヒト由来ブラディオオン蛋白質のアミノ酸レベルでの改変体もしくは変異体、ヒト以外の哺乳類由来の同等の性質をもつブラディオオンタンパク質が包含される。例えばマウス脳では、ヒト由来の2種のタイプのうち β 型のみが見出されたが、ヒト由来 β ブラディオオンとの相同性は94%であった。本発明の類似体は、ヒトブラディオオンの生物学的活性を損なわない範囲で部位特異的変異誘発法等の人工的改変法を用いてDNA組換え技術によって得ることができ、糖鎖は含んでも含まなくてもよい。また、ポリエチレングリコール等の水溶性ポリマーによって化学的に修飾されていてもよい。本発明はまた、上記に定義したブラディオオン蛋白質又はその類似体をコードする塩基配列を含むDNA又はその断片に関する。

【0009】そのようなDNA又はその断片の具体例と

して、配列番号1の129位から1943位までの塩基配列からなるDNA(即ちヒト α ブラディオオンをコードするDNA)又は該塩基配列の15個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上の連続するヌクレオチドからなる配列を有するDNA断片、或いは配列番号1に示す全塩基配列からなるDNA、並びに、配列番号3の129位から1562位までの塩基配列からなるDNA(即ちヒト β ブラディオオンをコードするDNA)又は該塩基配列の15個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上の連続するヌクレオチドからなる配列を有するDNA断片、或いは配列番号3に示す全塩基配列からなるDNAを挙げることができる。さらに、これらのDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも本発明に包含されるものとする。ここでストリンジントな条件とは、配列番号1(129~1943位)又は配列番号3(129~1562位)に示す塩基配列と90%以上の相同性、好ましくは95%以上の相同性、より好ましくは97%以上の相同性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。通常、完全ハイブリッドの融解温度(T_m)より約5℃~約30℃、好ましくは約10℃~約25℃低い温度でハイブリダイゼーションが起こる場合をいう。ストリンジントな条件については、J. Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、特に11.45節“Conditions for Hybridization of Oligonucleotide Probes”に記載されており、ここに記載の条件を使用し得る。本発明のDNA又はその断片は、ブラディオオン蛋白質の発現用だけでなく、ハイブリダイゼーション用のプローブとして、またPCR用のプライマーとしても使用することができる。

【0010】本発明はさらに、ブラディオオン蛋白質をコードするDNAを含むベクターに関する。ベクターは、該DNAが発現可能なように少なくともプロモーターを含有しており、その他に複製開始点、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結因子(ターミネーター)、選択マーカー、RNAスプライス部位、ポリアデニル化シグナル等の要素を含むことができる。本発明はさらにまた、そのようなベクターで形質転換若しくはトランスフェクションされた宿主細胞に関する。宿主細胞は原核細胞又は真核細胞のいずれでもよいが、好ましくは真核細胞、より好ましくは哺乳類細胞、特にヒト細胞株である。

【0011】本発明はまた、上記定義のブラディオオン蛋白質又はその類似体と免疫反応性である抗体に関する。抗体は、ブラディオオン蛋白質又はその類似体と特異的に

免疫反応するものが好ましく、ポリクローナル又はモノクローナル抗体のいずれでもよい。

【0012】本発明はさらに、癌の検出における、上記定義のDNAもしくはその断片又は上記定義の抗体の使用に関する。具体的には、本発明は、癌の検出における、下記のDNAもしくはその断片、または抗体の使用方法を提供する：

(1) 配列番号2もしくは配列番号4に示すアミノ酸配列を有するヒト由来ブラディオオン蛋白質をコードするDNA、または15個以上の連続するヌクレオチドの配列からなるその断片、

(2) 配列番号2または配列番号4に示すアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し且つ以下の性質：

(a) 膜蛋白質である、(b) Kyte-Doolittle法によるヒドロパシー分析により、膜貫通部分（一回）も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有する、(c) ヒト成人脳に強度の発現が認められ、心臓において脳の10%以下の発現が認められ、その他の臓器やヒト胎児には発現されない、(d) 未分化のヒト培養神経細胞に過剰発現させると、細胞死を誘導する、(e) 培養ヒト正常細胞に過剰発現させると、老化・分裂停止を誘導する、(f) 細胞死に至る過程で細胞質に存在して細胞内凝集体を形成し、24時間以内でミトコンドリアに集積する、及び (g) ヒト大腸癌細胞株又は皮膚癌細胞株で特異的に発現される、を有するDNA組換え技術により得ることができるヒト由来ブラディオオン蛋白質類似体をコードするDNA、または15個以上の連続するヌクレオチドの配列からなるその断片、

【0013】(3) 配列番号1に示す129位～1943位の塩基配列からなるDNAもしくはそれとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、または15個以上の連続するヌクレオチドの配列からなるそれらの断片、

(4) 配列番号3に示す129位～1562位の塩基配列からなるDNAもしくはそれとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、または15個以上の連続するヌクレオチドの配列からなるそれらの断片、

【0014】(5) 寄託微生物FERM BP-6922中に含まれるブラディオオンをコードするDNA、または15個以上の連続するヌクレオチドの配列からなるその断片、あるいは、

(6) 上記(1)～(5)のいずれかに記載のDNAまたはその断片によってコードされるヒト由来ブラディオオン蛋白質、その類似体、またはそれらの断片に対する抗体。ここで、癌は好ましくは、ヒト大腸癌またはヒト皮膚癌である。また、検出はハイブリダイゼーション又はイムノアッセイによって行うことができる。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明のブラディオオン蛋白質をコ

ードするcDNAは、以下のような方法によって得ることができる。まず、脳組織をグアニジンイソチオシアネートを含んだフェノール又はフェノールクロロフォルム溶液でホモジナイズし、高速遠心により水層と有機層に分離した後、水層に含まれる全RNAをイソプロパノールに加え沈殿させて回収するか、或いはショ糖もしくはセシウムクロライド密度勾配遠心法により回収する。この全RNAをオリゴ(dT)セルロースクロマトグラフィーにかけてmRNA（即ち、poly(A) RNA）を精製する。

【0016】次に、mRNAから逆転写酵素の存在下にcDNAを合成し、ファージ若しくはプラスミドベクターに連結可能なように適当な制限酵素部位を作り、これを同様の制限酵素部位をもつファージ若しくはプラスミドベクターに連結し、このようにして得られたベクターで大腸菌を形質転換又はトランスフェクションしてcDNAライブラリーを作製する。

【0017】クローン化cDNAライブラリーには、目的のDNA以外に種々の異なった情報をもったDNA断片が挿入されているため、目的のDNAを選抜する必要がある。選抜方法として、例えばブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等の方法を用いることができる。この方法によれば、寒天上に形成されたブランク（ファージベクターの場合）又はコロニー（プラスミドベクターの場合）をニトロセルロース膜若しくはナイロン膜に転写し、アルカリ溶液で処理した後、これに目的のDNAとハイブリダイズ可能な放射性(32P)若しくは蛍光標識DNAプローブを添加し結合させ、X線フィルム上で感光することにより、目的のDNAを含有するブランク又はクローンを検出し回収する。或いは、得られたクローン群を、イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド（IPTGという）等の誘導物質により蛋白質を強制発現させ、これをナイロン膜若しくはセルロース膜に転写し、目的蛋白質に対する特異抗体を用いて免疫学的に対応クローンを選抜することも可能である。

【0018】プローブに対して陽性反応を示したブランク又はクローンから回収した目的のcDNAについて、マキシム・ギルバート（Maxam-Gilbert）法又はサンガー・クルソン（Sanger-Coulson）法により配列決定する。クローニング法および配列決定については、例えばSambrookら、Molecular Cloning（上掲）、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Company Assoc. and John Wiley Interscience, NY, 1992等に記載される方法を参照することができる。

【0019】具体的には、後述の実施例に記載するよう

に、ヒト成人脳の cDNA ライブラリーを構築し、その陽性クローンから本発明のブラディオ蛋白質をコードする cDNA を取得した。配列分析の結果、選択的スライシングによるものと推定される 2 種の α 型、 β 型のブラディオ遺伝子が見出された。これらの塩基配列をそれぞれ配列番号 1 及び配列番号 3 に示したが、コーディング領域はそれぞれ 129 位～1943 位、129 位～1562 位であった。また、塩基配列から判明した α 型、 β 型のブラディオ蛋白質はそれぞれ配列番号 2 及び配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を有することがわかった。即ち、 α 型ブラディオ DNA は 1815 個のヌクレオチドからなり、605 個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしている。また、 β 型ブラディオ DNA は 1434 個のヌクレオチドからなり、478 個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしている。但し、配列番号 2 又は 4 に示されるアミノ酸配列中の 1 位の Met は欠失していてもよい。これらの配列をジーンバンクで精査したところ、 α 型、 β 型ともに新規の遺伝子及び蛋白質であることが判明した。

【0020】 α 及び β ブラディオ蛋白質は、Kyte-Doolittle 法 (J. Mol. Biol., 157 (1): 105-132, 1982) によるヒドロパシー分析により、膜貫通部分 (一回) も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有することがわかった。すなわち、細胞内シグナル伝達機構に関わると予想される膜貫通型受容体構造を有していることが示された。さらに、 α 型、 β 型という 2 種の発現様式があり、一方は多種生物にも恒存的であるところは、癌抑制遺伝子 p53/p73 の関係に類似している。また、細胞内凝集体形成は、トリプレットリピート遺伝子発現物質によるヒト神経退行性変異に見られるものと極めて大きな相同性を示す (Igarashi ら, Nature Genetics, 111-117, 1998; Martindale ら, Nature Genetics, 150-154, 1998) ことから、この遺伝子正常発現状態では発生・分化以降の脳神経細胞におけるヒト特異的神経細胞分裂停止及び機能維持に大きく関わっていると考えられる。

【0021】本発明のヒト由来ブラディオ蛋白質又はその類似体は例えば以下のように遺伝子組換え技術を利用して得ることができる。配列番号 1 又は 3 に示される塩基配列或いは配列番号 2 又は 4 に示されるアミノ酸配列に基いて、遺伝暗号の縮重を考慮しつつ、任意の連続する 15 以上、好ましくは約 20～約 50 個の塩基からなるハイブリダイゼーションプローブを作製し、これを用いてヒト又はヒト以外の哺乳類の脳組織に由来するゲノム DNA ライブラリー又は cDNA ライブラリーから、ブラディオ蛋白質をコードする DNA をスクリーニングすることができる。ライブラリーは、例えば λ ZAP II、pBluescript (登録商標) クローニングベクター

(Stratagene Cloning Systems) などの商業的に入手可能なベクターを用いて作製することが可能である。ブランクハイブリダイゼーション又はコロニーハイブリダイゼーションによって目的の DNA を含むブランク又はクローンを選択する。

【0022】或いは、配列番号 1 の 129～1943 位又は配列番号 3 の 129～1562 位に示される塩基配列に基いてそれに相補的な通常 15～100 スクレオチドの連続する DNA 配列をプライマーとして作製し、これを用いてヒト又は他の哺乳類の脳組織に由来するゲノム DNA ライブラリー又は cDNA ライブラリーについてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行なって目的の DNA を特異的に増幅することができる。PCR は例えば、変性 94℃, 1 分; アニリング 57℃, 2 分; 伸長 70℃, 3 分を 1 サイクルとして 20 サイクル以上、好ましくは 30 サイクル以上の条件を使用できる。PCR については例えば、蛋白核酸酵素「PCR 法最前線—基礎技術から応用まで—」第 4 巻, 第 5 号, 1996 年 4 月号増刊, 共立出版に記載されている技術を利用できる。目的の DNA をクローン化又は増幅した後、目的 DNA を回収し、これを入手可能な適当な発現ベクターに組み込み、さらに適当な宿主細胞に形質転換し、適当な培地中で培養、発現させ、目的蛋白質を回収、精製することができる。

【0023】本発明の類似体には、ヒト由来ブラディオ蛋白と実質的に同等の性質、特に上記性質中少なくとも (1)、(2)、(3)、(6)、(7) の性質をもつものか、或いは、配列番号 2 又は 4 に示されるアミノ酸配列において 1 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものが包含される。類似体として、配列番号 2 又は 4 に示されるアミノ酸配列と 90% 以上、好ましくは 95% 以上、より好ましくは 97% 以上の相同性を有するものが望ましい。このことは、ヒト α 又は β ブラディオ蛋白と実質的に同等の生物学的活性を有するのであれば、それらのアミノ酸配列に少なくとも 1 個のアミノ酸の欠失、置換又は付加の改変があってもよいことを意味する。例えば部位特異的突然変異/PCR 法などの周知の技術 (S. N. Ho ら, Gene 77, 51 (1989); 西郷薫と佐野弓子共訳, CURRENT PROTOCOLS コンパクト版, 分子生物学実験プロトコル I, 1997 年 6 月, 丸善) を用いることによって、遺伝子工学的に配列番号 2 又は 4 に示されるアミノ酸配列中に変異を導入することも可能である。置換の例としては、疎水性アミノ酸 (Ala、Val、Leu、Ile 等) 間の置換、Ser 及び Thr 間の置換、Asp 及び Glu 間の置換、Asn 及び Gln 間の置換、Lys 及び Arg 間の置換、Phe 及び Tyr 間の置換が挙げられる。付加の例としては、細菌性宿主での発現産物で認められる成熟蛋白の N 末端への Met の付加、成熟型蛋白に誘導し易くする

ためのN末端へのHisタグやMet-Lys若しくはMet-Arg配列の付加などが挙げられる。また、生物学的活性の喪失に導かない範囲で、ブラディオン蛋白質のカルボキシル末端又はアミノ末端側の幾つかのアミノ酸残基をトランケートすることも可能である。

【0024】さらに、遺伝子組換え技術によってブラディオン蛋白質又はその類似体をコードするDNAを発現する際に、宿主細胞として細菌等の原核細胞を用いるときには糖鎖のない蛋白質が生成され、一方、菌類、酵母、昆虫細胞、植物細胞、哺乳類細胞などの真核細胞中で発現された場合の生成物は糖鎖をもつものが得られる可能性がある。糖鎖導入は、DNA組換え技術、PCR法などにより配列上に任意にN結合型糖鎖部位(Asn-Xaa-Thr/Ser、ここでXaaはPro以外の任意のアミノ酸である)を導入することによっても可能である。いずれにせよ、得られる類似体はヒトブラディオンと実質的に同等の生物学的活性をもつべきである。

【0025】本発明のヒトブラディオン蛋白質又はその類似体は、そのN末端のアミノ基又はリシンのε-アミノ基にポリエチレングリコール(PEG)等の水溶性ポリマーを化学的に結合させることができる。PEG化は生体への投与時に抗原性又は免疫原性を低減又は抑制させることが知られている。本発明はさらに、上記DNAを含む発現ベクター、及びこのベクターを用いて形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞を提供する。

【0026】本発明のベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス等の形態であり得る。例えば、細菌プラスミド(pBR322、pKC30、pCFM536など)、ファージDNA(ラムダファージなど)、酵母プラスミド(pG-1など)、哺乳類細胞用のベクターとしてのバキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等のウイルスDNA、SV40とその誘導体など、宿主細胞において複製可能である限り他のいかなるベクターも用いることができる。ベクターは複製開始点、選択マーカー、プロモーターを含み、必要に応じてエンハンサー、転写終結配列(ターミネーター)、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル等を含んでもよい。

【0027】複製開始点として、大腸菌ベクターに対して、例えばColE1、R因子、F因子由来のものが、酵母用ベクターに対して、例えば2μm DNA、ARS1由来のものが、哺乳類細胞用ベクターに対して、例えばSV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス由来のものをを用いることができる。プロモーターは本発明のDNAをコードするmRNAの合成を指令するための調節配列であり、その代表的な例は、アデノウイルス又はSV40プロモーター、大腸菌lac又はtrpプロモーター、ファージラムダPLプロモーター、酵母用としてのADH、PHO5、GPD、PGK、AOX

1プロモーター、蚕細胞用としての核多角体病ウイルス由来プロモーターである。

【0028】選択マーカーは、形質転換宿主細胞を選択するための表現型を宿主に付与するための遺伝子であり、その例として、大腸菌用ベクターには、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を、酵母用ベクターには、Leu2、Trp1、Ura3遺伝子等を、哺乳類細胞用ベクターには、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を挙げることができる。

【0029】ベクターは商業的に入手可能なものを使用することができるが、そのようなベクターには、例えば、細菌性のものではpQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、pBluescript I I KS、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T(Pharmacia)、pET-11a(Novagen);及び真核性のものではpXT1、pSG5(Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL SV40(Pharmacia)がある。

【0030】本発明のDNAは任意の手段でベクター中に導入することができる。ベクターは、種々の制限部位をその内部にもつポリリンカーを含んでいるか、又は単一の制限部位を含んでいることが望ましい。ベクター中の特定の制限部位を特定の制限エンドスクレアーゼによって切断し、その切断部位に本発明のDNAを挿入する。本発明のDNA及び調節配列を含む発現ベクターを適切な宿主細胞の形質転換又はトランスフェクションに用いて宿主細胞に本発明のヒトブラディオン蛋白質又はその類似体を発現、産生させることができる。

【0031】宿主細胞の例としては、細菌細胞、例えば大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌など;真菌細胞、例えばアスペルギルス属菌株など;酵母細胞、例えばパン酵母、メタノール資化性酵母など;昆虫細胞、例えばドロソフィラS2、スボドプテラSf9など;ヒト培養細胞を含む哺乳類細胞、例えばCHO、COS、BHK、3T3、C127などが挙げられる。形質転換又はトランスフェクションは、塩化カルシウム/塩化ルビジウム法、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、電気穿孔法などの公知の方法で行うことができる。

【0032】本発明のヒト由来ブラディオン又はその類似体は、上記のように形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞をプロモーターの制御下において発現させ、産生した目的蛋白質を回収する。発現に際しては、宿主細胞を適切な細胞密度まで増殖又は成長させた後、プロモーターを温度シフト又は化学的誘発(IPTG等)手段によって誘発させ、細胞をさらに一定期間培養する。目的の蛋白質が細胞外に分泌される場合には培地

から直接に、また、細胞内に存在する場合には物理的手段（超音波破壊、機械的破壊）若しくは化学的手段（リゾチームや細胞溶解剤）によって細胞を破壊した後に、目的の蛋白質を精製する。例えば蛋白質は、組換え細胞の培養培地又はその抽出液から、硫酸アンモニウム若しくはエタノール沈殿、酸抽出、アニオン若しくはカチオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、HPLC、電気泳動、クロマトフォーカシングなどの慣用の技術を組合わせて部分的に又は完全に精製することができる。

【0033】本発明のDNAを種々のヒト細胞株及び癌細胞株に遺伝子導入することによってブラディオン蛋白質の機能を調べた結果、前述の知見に加えて、次のことが明らかになった。（1）本発明のDNAを、未分化のヒト培養神経細胞であるヒト培養神経細胞NT2 neuron（Stratagene製）にSuperfect試薬（Qiagen製）を用いて遺伝子導入し、過剰発現させると、18～24時間以内に細胞死を誘導した。（2）同様の方法で培養ヒト正常細胞に過剰発現させると、老化・分裂停止を誘導した。（3）培養癌細胞への遺伝子導入は α 型のみ細胞死を誘導し、 β 型では細胞死が観察されなかった。（4）細胞死に至る過程でブラディオン蛋白質は細胞質に存在して細胞内凝集体を形成し24時間以内にミトコンドリアに集積した。さらにまた、培養ヒト癌細胞を用いた研究により、ブラディオンが大腸直腸癌細胞株及びメラノーマ（皮膚癌）細胞株への特異的発現が検出され、脳神経系以外の組織においても癌化に伴って特異的に機能発現していることが判明した。

【0034】以上の知見に基づいて、本発明のブラディオン蛋白質は、中枢の脳神経細胞における神経刺激伝達を介した非分裂状態での生存を可能にしていると考えられる。これは、遺伝子の過剰発現において細胞寿命の停止を指令し、また、 α 及び β 型の発現比率（正常脳神経細胞において10:1）を維持することが重要と考えられる。この発現比率の変化（例えば1:1）により、癌化を誘導することも示唆された。従って、ブラディオン蛋白質は、脳神経細胞の発生・分化後の長期にわたる非分裂状態のままの生存を決定づける細胞寿命制御・癌化

【0035】したがって、本発明の蛋白質もしくはその断片、それらに対する抗体、又は本発明のDNAもしくはその断片を、癌（例えばヒト大腸がんやヒト皮膚癌）の検出もしくはは診断、或いは細胞寿命制御・癌化制御

のための治療に使用することできる。このような目的には、該蛋白質を単特異的に認識するポリクローナル又はモノクローナル抗体が有用である。抗体、特にモノクローナル抗体は診断、ワクチン、ドラッグデリバリーシステムなどに使用できる。抗体の作製に関しては、例えば松橋直ら、生物化学実験法15、免疫学実験入門（1982年）、学会出版センター；岩崎辰夫ら、単クローン抗体—ハイブリドーマとELISA—（1987年）、講談社サイエンティフィック等に記載される方法を使用できる。

10 【0036】ポリクローナル抗体は、本発明の蛋白質又はその断片を抗原とし、その抗原液とFreundの完全アジュバントとを混合して乳濁液を形成した後、ウサギ、マウス、ヤギ、ウシ、ウマ等の哺乳動物の皮下に注射し、約2週間後Freundの不完全アジュバントに乳濁させた抗原液を動物に同様に注射し、必要によりブーストし、採血することによって抗血清として得ることができる。さらに、抗血清を硫酸塩析、DEAEセルロースを用いるイオン交換クロマトグラフィーなどによってIgGを得、本発明の蛋白質又はその断片をCNBr

20 活性化Sephadex若しくはSephacroseに結合させたアフィニティークロマトグラフィーにIgG画分をアプライし、免疫反応により結合した目的の抗体を単特異的に精製することができる。

【0037】モノクローナル抗体は、上記と同様に調製した抗原—アジュバント乳濁液をマウス（BALB/c等）の腹腔内に注射しマウスを免疫し、脾臓を摘出し、脾臓細胞を得た後、この細胞をミエローマ細胞（X63、NS-1等）とポリエチレングリコール（PEG4000等）の存在下に融合させ、HAT培地で抗体産生

30 ハイブリドーマを選択し、クローニング法か又はマウス腹腔内注射後の腹水から目的のモノクローナル抗体を得ることができる。また、Tengら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1983）, 80:7308-7312、Kozborら、Immunology Today（1983）, 4（3）:72-79に記載されるような公知の技術を用いてヒト化モノクローナル抗体を作製することも可能である。上記抗体を癌などの診断に用いる場合の免疫学的方法として、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法などの慣用のイムノアッセイ法を使用できる。

40 【0038】さらに、本発明のDNA又はその断片をプローブ又はプライマーとして使用する場合、配列番号1（129～1943位）又は配列番号3（129～1562位）に示される塩基配列中の任意の連続する15個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上のヌクレオチドからなるプローブ又はプライマーを自動DNA合成機を用いて作製し、アイソトープ、蛍光物質等で標識後に診断用プローブ又はPCRプライマーとして使用することができる。ハイブリダイゼーション

50 を行なう場合の条件は、Sambrookら、Mole

cular Cloning (上掲)、F. M. Ausubelら、Short Protocols In Molecular Biology, Third Edition, John Wiley & Sonsに記載される条件を使用できる。

【0039】

【実施例】本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

＜実施例1＞ヒトブラディオンをコードするcDNAのクローニング及び配列決定

初めに、真核細胞での発現のためのCMVプロモーターに接続できるプラスミドベクターpCMV SPORT 1 (Life Technologies 社(米国))を用いてヒト成人脳のcDNAライブラリーを構築した。この時、成人脳は、米国の36歳のコーカサス系白人女性からの検体であり、Life Technologies 社製のトリゾール試薬(商品名)にてmRNA (poly (A) RNA)を抽出、メッセージメーカー試薬 (Life Technologies 社)によりmRNA (poly (A) RNA)を精製、スーパースクリプトプラスミドシステムにより二本鎖cDNA合成・ライブラリー構築を開始した。

【0040】上記で調製したmRNA (poly (A)

RNA)の3'末端にNot Iプライマーアダプターを結合させた後、これを、逆転写酵素Super Script II及びT4 DNAポリメラーゼを用い、定法に従い2本鎖cDNAを合成・調製した。次いで、cDNA鎖の5'末端にSal Iアダプターを付加、3'末端を制限酵素Not Iで処理して、制限酵素による切断部位Sal I-Not Iを両端に持つcDNA断片とした。このcDNAをゲルろ過クロマトグラフィーによりサイズ毎に分離し、1 kb以上の大きさをもったcDNAを選択、分取した。得られたcDNA断片群を、同じくSal I-Not Iで切断されたプラスミドベクターpCMV SPORT 1に挿入して、定法により環状プラスミドを作製した。これを、大腸菌DH12S細胞 (Life Technologies 社)にエレクトロポレーション法を用いて導入し、増殖させ、ライブラリーを構築した。

【0041】この大腸菌群を抗生物質アンピシリン添加LB寒天培地上に増殖させてコロニーを形成した。このコロニーの上に、10 mM IPTGで処理したバイオダインAナイロン膜 (Pall 社、米国)を密着させて37℃で2時間静置、その後ナイロン膜を脳神経細胞を特異的に認識する抗体CE5 [Nature, 296, 34-38, (1982)]に反応させ、picoBlue™ Immunoscreening Kit (STRATAGENE, 米国)にて陽性クローンを選別した。

【0042】得られた陽性クローンよりプラスミドDNAを採取し、それを32P標識プローブとしてヒト各臓器特異的mRNA転写ナイロン膜 (MTN blot, Clontech 社)にハイブリダイズさせ、脳特異的かどうかを検定した。cDNAは、シーケンス解析により塩基配列を決定し、遺伝子バンクによる相同性をもつ他の配列と比較検討し、全く新規配列と認められたもののみを目的に添うものとして遺伝子バンクに登録した。かくして決定された α ブラディオンのcDNAの塩基配列を配列表の配列番号1 (ジーンバンク登録ナンバー: AB002110)に示した。コーディング領域は129~1943位であった。また、この塩基配列に基いて決定された α ブラディオンのアミノ酸配列を配列番号2に示した。 α ブラディオンのcDNAを含むDNAは、平成10年7月14日に工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1-1-3)にFERMP-16897として寄託された。

【0043】上記 α ブラディオンのcDNAの配列を基に、5'末端プライマー(下記)を合成し、関連遺伝子の系統的探索を行った。そのために、Gene Trapper Positive Selection system (Life Technologies 社製)を用いて、合成オリゴヌクレオチドとマグネットビーズによる上記遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行った。用いたオリゴヌクレオチドの配列は、5'-ctgagcaagtttcgtgaaggatttc-3' (配列番号5)及び5'-cagtcctctgacaaccagcagta-3' (配列番号6)である。その結果 β ブラディオンの命名する遺伝子が検出され、その塩基配列を配列表の配列番号3 (ジーンバンク登録ナンバー: AB008753)に示した。コーディング領域は129~1562位であった。この塩基配列に基いて決定された β ブラディオンのアミノ酸配列を配列番号4に示した。

【0044】＜実施例2＞ α 及び β ブラディオンの特徴付け

(1) ヒドロパシー分析

実施例1で決定された α 及び β ブラディオンの蛋白質のアミノ酸配列について、Kyte-Doolittle法 (Kyte, J. とDoolittle, R. F. J., J. Mol. Biol. (1982), 157 (1): 105-132)によるヒドロパシー分析を行った。この分析法は蛋白質のアミノ酸配列からその高次構造を推定する方法の1つであり、蛋白質中の疎水性及び親水性部分の分布を知ることができ、これに基いて立体構造の有無や膜貫通ドメインの存在を推定することが可能である。図1a、図1bには、分析結果を示しているが、同時にヒト由来のインターロイキン (IL) 2レセプター、IL3レセプター、IL4レセプター及び成長ホルモンレセプターについての分析結果も比較の

ために示した。図から、成長ホルモン・サイトカインレセプター配列を有する蛋白質は、膜貫通部分（左から3番目の枠（赤色で示す））である疎水基の集合部分（計算上プラスとして出る）及びその前部の細胞質外部分（左から2番目の枠（青色で示す））、さらに後部の細胞質内部分（左から4番目の枠（緑色で示す））に大別されることがわかる。これらの構造は各レセプターに共通であり、本発明のブラディオオンも同様の構造を有することが判明した。ただし、ブラディオオンは、疎水基部分であるシグナルペプチド（左から1番目の枠（黄色で示す））を有していない。結果として、本発明のブラディオオンは膜蛋白質であり、そのアミノ酸配列において膜貫通部分（一回）も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有することがわかった。

【0045】（2）ブラディオオン蛋白質の局在
ヒト各臓器特異的mRNA転写ナイロン膜（MTN blot、Clontech社）へのハイブリダイゼーションにより、ヒト成人脳に強度の発現が認められ、他には心臓においてわずかな発現（脳の10%以下）が認められるのみであった。他の臓器、ヒト胎児には発現されなかった。成人脳においては、上記 α 及び β タイプが発現しており、その差は選択的スプライシングによって生じたものと考えられた。マウス脳にも相同遺伝子配列が存在するが、1種類のみであり、それはヒトの2種のタイプのうち、 β 型（94%の相同性）のみであった。

【0046】（3） α 及び β ブラディオオン遺伝子の培養細胞への導入実験

α 及び β ブラディオオンDNAをそれぞれヒト培養神経細胞NT2 neuron（STRATAGENE社）、すなわち未分化のヒト培養神経細胞、にSuperfect試薬（QIAGEN、米国）を用いて遺伝子導入し、過剰発現させた。結果を図2a, b, cに示す。

【0047】図2のパネルaには、 α （上段）及び β （下段）ブラディオオン遺伝子の遺伝子導入後24時間の標識像について、左に α （上段）及び β （下段）ブラディオオンの存在位置を、中にミトコンドリアの存在部位を、右に左と中のダブルイメージを示した。像はすべて共焦点レーザー顕微鏡によって観察された。その結果、 α ブラディオオンはミトコンドリアに一致した存在（赤色+緑色で黄色く呈色する）を示し、 β ブラディオオンでは一致しないことがわかった。

【0048】さらに、 α ブラディオオン遺伝子導入後、18～24時間以内に細胞死が誘導されるが、死に至る過程で α ブラディオオンは細胞内凝集体を形成し、ミトコンドリアに集積することが示された。パネルbには、遺伝子導入後の表示の各時間における細胞像を示し、左がヒト培養細胞NT2 neuron（STRATAGENE

社）、右がヒト癌細胞HeLaである。その結果、どちらの細胞系列においても、細胞質内凝集体の形成と細胞死が認められた。この事実を確認するために、パネルbの細胞を用いて電子顕微鏡観察を行ったところ、パネルcに示されたように、プログラム細胞死（アポトーシス）に特異的なアポトーシス小体の存在が確認された。

【0049】（4） α 及び β ブラディオオン遺伝子と癌との相関

α 及び β ブラディオオン遺伝子は、正常の組織では、脳及びごく僅かに（脳の約10%）心臓でしか発現しないにも拘らず、培養癌細胞での発現が認められた。結果を図3a, 3b, 3cに示した。図3aには、異なる培養ヒト癌細胞における α 及び β ブラディオオン遺伝子の発現検定をノーザンブロッティングにより行った結果を示した。レーン8（皮膚癌細胞株G361）及びレーン6（大腸癌細胞株SW480）にのみ特異的発現反応（シグナル）が認められた。

【0050】そこで、ヒト患者検体（病理組織標本）を用いて、発現の検定を検索したところ、図3bに示すとおり、10検体の大腸癌（T1～T10；Adとして記載）、3検体の皮膚癌（T11～T13；Muc, MMとして記載）において特異的発現が確認された。図3cには、その遺伝子発現確認を組織染像として示した。上記の結果は、 α 及び β ブラディオオン並びにそれらをコードする遺伝子が、大腸癌や皮膚癌等の癌の腫瘍マーカーとして使用できることを示している。

【0051】

【発明の効果】本発明のブラディオオン及びそれをコードするDNAは、中枢の脳神経細胞における神経刺激伝達を介した非分裂状態での生存を可能にしていると考えられる。これは、遺伝子の過剰発現において細胞寿命の停止を指令し、また、生体内では α 及び β 型の発現比率（正常脳神経細胞において10:1）が維持されていると考えられる。この発現比率の変化（例えば1:1）により、癌化を誘導することも示唆される。従って、ブラディオオン及びそれをコードするDNAは、脳神経細胞の発生・分化後の長期に渡る非分裂状態のままの生存を決定づける、細胞寿命制御・癌化制御因子として働くことと推定され、老化に伴う神経細胞の脱落のモニタリング、脳虚血やてんかん重積状態で発生する神経細胞壊死などの解明、中枢における神経細胞の生存機構、脳の病態の理解に有用である他、遺伝病の治療や新規医薬品の創製にも有用である。また、癌の遺伝子診断および遺伝子治療への応用も可能である。

【0052】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Agency of Industrial Science and Technology

<120> Cancer detecting methods

<130>

<140>

<141>

<160> 6

<170> Windows 95

<210> 1

<211> 2274

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (129) ... (1943)

<400> 1

gaaaggagca agccaggaag ccagacaaca acagcatcaa aacaaggctg tttctgtgtg	60
tgaggaaatt tgccctgggag ataaaattag acctagagct ttctgacagg gagtctgaag	120
cgtgggacat ggaccgttca ctgggatggc aagggaaattc tgtccctgag gacaggactg	180
aacctgggat caaccgtttc ctggaggaca ccacggatga tggagaactg agcaagtctg	240
tgaaggattt ctcaggaaat gcgagctgcc acccaccaga ggctaagacc tgggcatcca	300
ggccccaagt cccggagcca agggcccagg ccccggaact ctatgatgat gacctggagt	360
tcagaccccc ctgcgggcc cagtcctctg acaaccagca gtacttctgt gccccagccc	420
ctctcagccc atctgccagg ccccgagcc catggggga gcttgatccc tatgattcct	480
ctgaggtaga gcctccagcc ctgcctttgc ctttcagtgg gctgctgcag gaagaccggg	540
ggcaggggagc aggaatgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtttgtgt	600
gtgtgtgtat ctgggaccca tticagtcct gtgtcagccc tagctccaaa atatctgccc	660
ccaagggcac tggaaatttg cagtttcagc aagggcagga ggcccagctg gtggcctcag	720
atgggaactc acagaagtct ggcaactgct ttttaaggct ggggcaaagg cctgaaaggg	780
agagaagatt ggcgctgggt gccggggccc ctttggtcc tcaccgtgat gcattctgcc	840
ttcctgtcta ctacgatgac aaggagtatg tgggctttgc aacctcccc aaccaagtcc	900
accgaaagtc cgtgaagaaa ggctttgact ttacctcat ggtggcagga gagtctggcc	960
tgggcaaadc cacacttgct aatagcctct tctcactga tctgtaccgg gaccggaaac	1020
ttcttggtgc tgaagaaagg atcatgcaaa ctgtggagat cactaagcat gcagtggaca	1080
tagaaaaaaa aggtgtgagg ctgcggctca ccattgtgga cacaccaagt ttgggggatg	1140
cagtcaacaa cacagagtgt atgtctgact ggaagcctgt ggcagaatac attgatcagc	1200
agtttgagca gtatttccga gacgagagtg gcctgaaccg aaagaacatc caagacaaca	1260
gggtgcactg ctgcctgtac ttcatctcac ccttcggcca tgggctccgg ccattggatg	1320
ttgaattcat gaaggccctg catcagcggg tcaacatcgt gcctatcctg gctaaggcag	1380
acacactgac acctcccga gtggaccaca agaaacgcaa aatccgggag gagattgagc	1440
attttggaat caagatctat caattcccag actgtgactc tgatgaggat gaggacttca	1500
aattgcagga ccaagcccta aaggaaagca tccattttgc agtaattggc agcaaacctg	1560
tagtagaggc cagagggcgg cgagttcggg gtcgactcta cccctggggc atcgtggaag	1620
tggaaaaccc agggcactgc gactttgtga agctgaggac aatgctggta cgtaccaca	1680
tgcaggacct gaaggatgtg acacgggaga cacattatga gaactaccgg gcacagtgca	1740
tccagagcat gacccgcctg gtggtgaatg aacggaatcg caagtatgac cagaagccag	1800
gacaaagctg gcagggggag atcccaagcc tagccttggg tgagaccaag ccctactttt	1860
gttcttctat aggccctggg ctcaatctaa gcgggtgctg gggtcctcct cgccttatca	1920
acctttttct ccttttagca aactgactcg ggaaagtgt accgacttcc ccatccctgc	1980

19

20

tgtccacca gggacagatc cagaaactga gaagcttatt ccagagaaag attaggagct 2040
 gcggcggata cacgagatac tacaccaaat accaaaacag ataaaggaga actatttact 2100
 ggctttcagc cctggatatt taaatctcct cctcttcttc ctgtccatgc cggcccctcc 2160
 cagcaccagc tctgctcagg ccccttcagc tactgccact tcgccittaca tccctgctga 2220
 ctgccagag actcagagga aataaagttt aataaatctg taggtggctt ctgg 2274

<210> 2

<211> 605

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Arg Ser Leu Gly Trp Gln Gly Asn Ser Val Pro Glu Asp Arg
 1 5 10 15
 Thr Glu Pro Gly Ile Asn Arg Phe Leu Glu Asp Thr Thr Asp Asp Gly
 20 25 30
 Glu Leu Ser Lys Phe Val Lys Asp Phe Ser Gly Asn Ala Ser Cys His
 35 40 45
 Pro Pro Glu Ala Lys Thr Trp Ala Ser Arg Pro Gln Val Pro Glu Pro
 50 55 60
 Arg Pro Gln Ala Pro Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Leu Glu Phe Arg Pro
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Pro Gln Ser Ser Asp Asn Gln Gln Tyr Phe Cys Ala Pro
 85 90 95
 Ala Pro Leu Ser Pro Ser Ala Arg Pro Arg Ser Pro Trp Gly Glu Leu
 100 105 110
 Asp Pro Tyr Asp Ser Ser Glu Val Glu Pro Pro Ala Leu Pro Leu Pro
 115 120 125
 Phe Ser Gly Leu Leu Gln Glu Asp Arg Gly Gln Gly Ala Gly Met Cys
 130 135 140
 Val Cys Val Cys Val Cys Val Cys Val Cys Val Phe Val Cys Val Cys
 145 150 155 160
 Ile Trp Asp Pro Phe Gln Ser Cys Val Ser Pro Ser Ser Lys Ile Ser
 165 170 175
 Ala Pro Lys Gly Thr Gly Asn Leu Gln Phe Gln Gln Gly Gln Glu Ala
 180 185 190
 Gln Leu Val Ala Ser Asp Gly Asn Ser Gln Lys Ser Gly Thr Ala Phe
 195 200 205
 Leu Arg Leu Gly Gln Arg Pro Glu Arg Glu Arg Arg Leu Ala Leu Gly
 210 215 220

 Ala Gly Ala Pro Leu Ala Pro His Arg Asp Ala Phe Cys Leu Pro Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Asp Asp Lys Glu Tyr Val Gly Phe Ala Thr Leu Pro Asn Gln
 245 250 255
 Val His Arg Lys Ser Val Lys Lys Gly Phe Asp Phe Thr Leu Met Val
 260 265 270
 Ala Gly Glu Ser Gly Leu Gly Lys Ser Thr Leu Val Asn Ser Leu Phe
 275 280 285
 Leu Thr Asp Leu Tyr Arg Asp Arg Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Arg
 290 295 300
 Ile Met Gln Thr Val Glu Ile Thr Lys His Ala Val Asp Ile Glu Lys

21
 305 310 315 320
 Lys Gly Val Arg Leu Arg Leu Thr Ile Val Asp Thr Pro Ser Phe Gly
 325 330 335
 Asp Ala Val Asn Asn Thr Glu Cys Met Ser Asp Trp Lys Pro Val Ala
 340 345 350
 Glu Tyr Ile Asp Gln Gln Phe Glu Gln Tyr Phe Arg Asp Glu Ser Gly
 355 360 365
 Leu Asn Arg Lys Asn Ile Gln Asp Asn Arg Val His Cys Cys Leu Tyr
 370 375 380
 Phe Ile Ser Pro Phe Gly His Gly Leu Arg Pro Leu Asp Val Glu Phe
 385 390 395 400
 Met Lys Ala Leu His Gln Arg Val Asn Ile Val Pro Ile Leu Ala Lys
 405 410 415
 Ala Asp Thr Leu Thr Pro Pro Glu Val Asp His Lys Lys Arg Lys Ile
 420 425 430
 Arg Glu Glu Ile Glu His Phe Gly Ile Lys Ile Tyr Gln Phe Pro Asp
 435 440 445
 Cys Asp Ser Asp Glu Asp Glu Asp Phe Lys Leu Gln Asp Gln Ala Leu
 450 455 460
 Lys Glu Ser Ile Pro Phe Ala Val Ile Gly Ser Asn Thr Val Val Glu
 465 470 475 480
 Ala Arg Gly Arg Arg Val Arg Gly Arg Leu Tyr Pro Trp Gly Ile Val
 485 490 495
 Glu Val Glu Asn Pro Gly His Cys Asp Phe Val Lys Leu Arg Thr Met
 500 505 510
 Leu Val Arg Thr His Met Gln Asp Leu Lys Asp Val Thr Arg Glu Thr
 515 520 525
 His Tyr Glu Asn Tyr Arg Ala Gln Cys Ile Gln Ser Met Thr Arg Leu
 530 535 540
 Val Val Asn Glu Arg Asn Arg Lys Tyr Asp Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 545 550 555 560
 Trp Gln Gly Glu Ile Pro Ser Leu Ala Leu Gly Glu Thr Lys Pro Tyr
 565 570 575
 Phe Cys Ser Ser Ile Gly Pro Gly Leu Asn Leu Ser Gly Cys Trp Gly
 580 585 590
 Pro Pro Arg Leu Ile Asn Pro Phe Leu Pro Leu Ala Asn
 595 600 605

<210> 3

<211> 1735

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (129)···(1562)

<400> 3

gaaaggagca agccaggaag ccagacaaca acagcatcaa aacaaggctg tttctgtgtg 60
 tgaggaactt tgccctggag ataaaattag acctagagct ttctgacagg gagtctgaag 120
 cgtgggacat ggaccgttca ctgggatggc aaggggaattc tgtccctgag gacaggactg 180
 aagctgggat caagcgtttc ctggaggaca ccacggatga tggagaactg agcaagttcg 240
 tgaaggattt ctcaggaaat gcgagctgcc acccaccaga ggctaagacc tgggcatcca 300

23

24

```

ggccccagt cccggagcca agggcccagg ccccggaacct ctatgatgat gacctggagt 360
tcagaccccc ctgcggcccc cagtccctctg acaaccagca gtacttctgt gcccagagccc 420
ctctcagccc atctgccagg ccccgagccc catggggcaa gcttgatccc tatgattcct 480
ctgaggatga caaggagtat gtgggctttg caaccctccc caaccaagtc caccgaaagt 540
ccgtgaagaa aggcctttgac tttaccctca tgggtggcagg agagtctggc ctgggcaaat 600
ccacacttgt caatagcctc ttctcactg atctgtaccg ggaccggaaa ctcttggtg 660
ctgaagagag gatcatgcaa actgtggaga tctaagca tgcagtggac atagaagaga 720
aggggtgtgag gctgcggctc accattgtgg acacaccagg ttttggggat gcagtcaaca 780
acacagagtg ctggaagcct gtggcagaat acattgatca gcagtttgag cagtatttcc 840
gagacgagag tggcctgaac cgaagaaca tccaagaca caggggtgcac tgctgcctgt 900
acttcatctc acccttcggc catgggctcc ggccattgga tgttgaattc atgaaggccc 960
tgcatcagcg ggtcaacatc gtgcctatcc tggctaaggc agacacactg acacctcccg 1020
aagtggacca caagaacgc aaaatccggg aggagattga gcattttgga atcaagatct 1080
atcaattccc agactgtgac tctgatgagg atgaggactt caaattgcag gaccaagccc 1140
taaaggaaag catccattt gcagtaattg gcagcaacac ttagtagag gccagagggc 1200
ggcgagttcg gggtcgactc taccctggg gcacgtgga agtggaaaac ccagggcact 1260
gcgactttgt gaagctgagg acaatgctgg tacgtacca catgcaggac ctgaaggatg 1320
tgacacggga gacacattat gagaactacc gggcacagtg catccagagc atgacccgcc 1380
tggtggtgaa ggaacggaat cgacaacaac tgactcggga aagtgtgacc gacttcccca 1440
tccctgtgt cccaccaggg acagatccag aaactgagaa gcttatccga gagaaagatg 1500
aggagctgcg gcggatgcag gagatgctac aaaaaataca aaacagatg aaggagaact 1560
attaactggc tticagccct ggatatitaa atctcctct cttcttctg tccatgccgg 1620
cccctccag caccagctct gctcaggccc cttcagctac tgccacttgc cctaacatcc 1680
ctgctgactg cccagagact cagaggaaat aaagttaat aaatctgtag gtggc 1735

```

<210> 4

<211> 478

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Asp Arg Ser Leu Gly Trp Gln Gly Asn Ser Val Pro Glu Asp Arg
  1             5             10            15
Thr Glu Ala Gly Ile Lys Arg Phe Leu Glu Asp Thr Thr Asp Asp Gly
          20             25             30
Glu Leu Ser Lys Phe Val Lys Asp Phe Ser Gly Asn Ala Ser Cys His
          35             40             45
Pro Pro Glu Ala Lys Thr Trp Ala Ser Arg Pro Gln Val Pro Glu Pro
          50             55             60
Arg Pro Gln Ala Pro Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Leu Glu Phe Arg Pro
          65             70             75             80
Pro Ser Arg Pro Gln Ser Ser Asp Asn Gln Gln Tyr Phe Cys Ala Pro
          85             90             95
Ala Pro Leu Ser Pro Ser Ala Arg Pro Arg Ser Pro Trp Gly Lys Leu
          100            105            110
Asp Pro Tyr Asp Ser Ser Glu Asp Asp Lys Glu Tyr Val Gly Phe Ala
          115            120            125
Thr Leu Pro Asn Gln Val His Arg Lys Ser Val Lys Lys Gly Phe Asp
          130            135            140
Phe Thr Leu Met Val Ala Gly Glu Ser Gly Leu Gly Lys Ser Thr Leu
          145            150            155            160
Val Asn Ser Leu Phe Leu Thr Asp Leu Tyr Arg Asp Arg Lys Leu Leu

```

25 165 170 175
 Gly Ala Glu Glu Arg Ile Met Gln Thr Val Glu Ile Thr Lys His Ala
 180 185 190
 Val Asp Ile Glu Glu Lys Gly Val Arg Leu Arg Leu Thr Ile Val Asp
 195 200 205
 Thr Pro Gly Phe Gly Asp Ala Val Asn Asn Thr Glu Cys Val Lys Pro
 210 215 220
 Val Ala Glu Tyr Ile Asp Gln Gln Phe Glu Gln Tyr Phe Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Ser Gly Leu Asn Arg Lys Asn Ile Gln Asp Asn Arg Val His Cys Cys
 245 250 255
 Leu Tyr Phe Ile Ser Pro Phe Gly His Gly Leu Arg Pro Leu Asp Val
 260 265 270
 Glu Phe Met Lys Ala Leu His Gln Arg Val Asn Ile Val Pro Ile Leu
 275 280 285
 Ala Lys Ala Asp Thr Leu Thr Pro Pro Glu Val Asp His Lys Lys Arg
 290 295 300
 Lys Ile Arg Glu Glu Ile Glu His Phe Gly Ile Lys Ile Tyr Gln Phe
 305 310 315 320
 Pro Asp Cys Asp Ser Asp Glu Asp Glu Asp Phe Lys Leu Gln Asp Gln
 325 330 335
 Ala Leu Lys Glu Ser Ile Pro Phe Ala Val Ile Gly Ser Asn Thr Val
 340 345 350
 Val Glu Ala Arg Gly Arg Arg Val Arg Gly Arg Leu Tyr Pro Trp Gly
 355 360 365
 Ile Val Glu Val Glu Asn Pro Gly His Cys Asp Phe Val Lys Leu Arg
 370 375 380
 Thr Met Leu Val Arg Thr His Met Gln Asp Leu Lys Asp Val Thr Arg
 385 390 395 400
 Glu Thr His Tyr Glu Asn Tyr Arg Ala Gln Cys Ile Gln Ser Met Thr
 405 410 415
 Arg Leu Val Val Lys Glu Arg Asn Arg Asn Lys Leu Thr Arg Glu Ser
 420 425 430
 Gly Thr Asp Phe Pro Ile Pro Ala Val Pro Pro Gly Thr Asp Pro Glu
 435 440 445
 Thr Glu Lys Leu Ile Arg Glu Lys Asp Glu Glu Leu Arg Arg Met Asp
 450 455 460
 Glu Met Leu His Lys Ile Gln Lys Gln Met Lys Glu Asn Tyr
 465 470 475

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: a 5'-end primer synthesized based on the nucleotide sequence of cDNA for alpha-Bradeion.

<400> 5

ctgagcaagt tcgtgaagga ttic

24

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: a 5'-end primer synthesized based on the nucleotide sequence of cDNA for alpha-Bradeion.

<400> 6

cagtcctctg acaaccagca gta

23

【0053】

【配列表フリーテキスト】配列番号5—合成配列の説明： β -ブラディオンcDNAの塩基配列に基いて合成された5'末端側プライマー

配列番号6—合成配列の説明： α -ブラディオンcDNAの塩基配列に基いて合成された5'末端側プライマー

【図面の簡単な説明】

【図1a】この図は、 α ブラディオンの疎水性、親水性部分の分布を、IL2、IL3、IL4の各レセプター、成長ホルモンレセプターと比較して示したKyte-Doolittle法によるヒドロパシー分析の結果を示す写真である。

【図1b】この図は、 α ブラディオンの疎水性、親水性部分の分布を、IL2、IL3、IL4の各レセプター、成長ホルモンレセプターと比較して示したKyte-Doolittle法によるヒドロパシー分析の結果を示す写真である（図1aのつづき）。

【図2】この図は、 α 及び β ブラディオン遺伝子を培養NT2neuron（未分化のヒト神経細胞）及びHeLa細胞に導入し過剰発現させたときの、共焦点レーザー顕微鏡による標識像（パネルaの場合NT2neuron；パネルbの場合NT2neuronとHeLa）、並びに、パネルbの細胞（18hrsと24hrs）についての電顕像（パネルc）を示す写真である。パネルa中、EGFP（Enhanced Green Fluorescent Protein；Clontech社製）によるブラディオン遺伝子の存在部位を、Mitochondriaはミトコンドリアにおけるブラディオン遺伝子の存在部位を、Overlayは左の標識像と中の標識像を重ね合わせた像をそれぞれ示している。

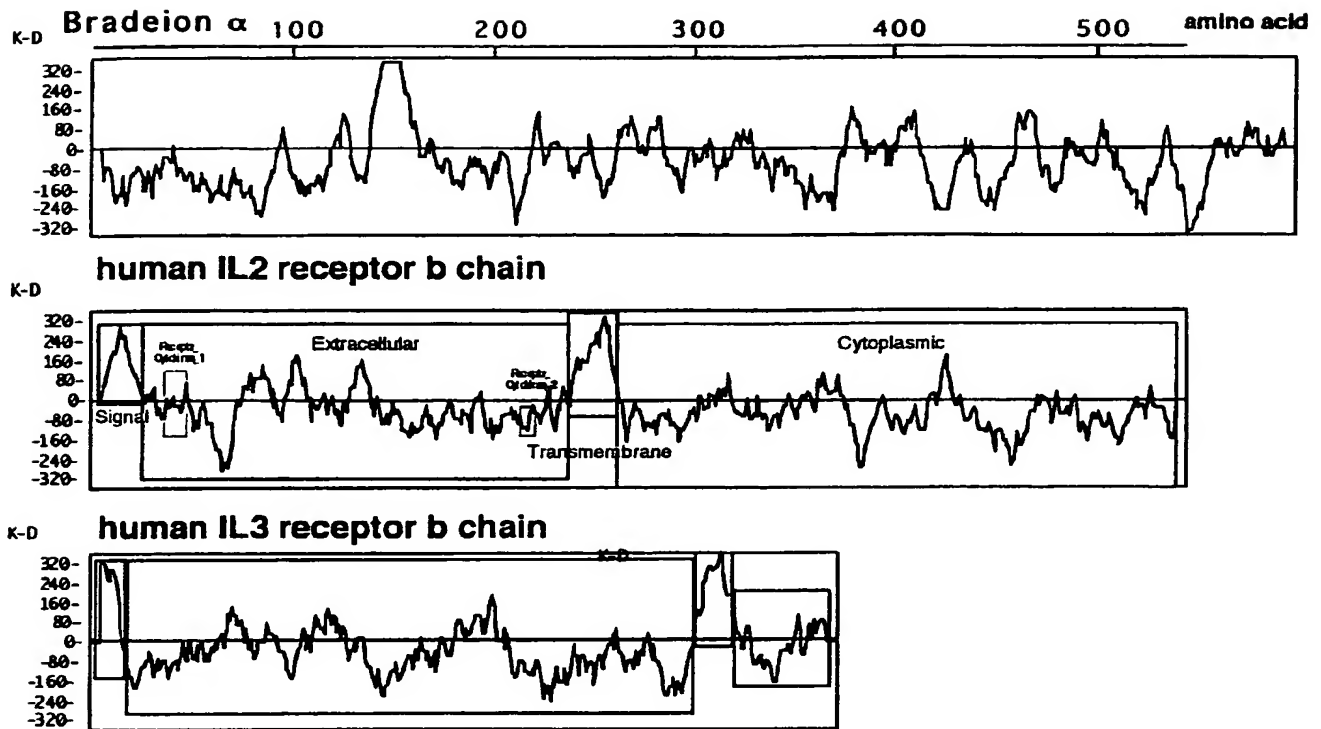
【図3a】この図は、ヒト癌細胞株における α 及び β ブラディオン遺伝子の等量発現を示す写真である。放射性標識ブラディオン遺伝子を用いたノーザンブロット解析の結果を示す。レーン1は、多発骨髓球性白血病（p o

l myelocytic leukemia）、HL60；レーン2は、HeLaS3；レーン3は、慢性ミロジナス白血病（chronic myelogenous leukemia）、K-562；レーン4は、リンパ芽球性白血病（lymphoblastic leukemia）、MOLT-4；レーン5は、バーキットリンパ腫（Burkitt's lymphoma）、Raji；レーン6は、大腸癌（colorectal adenocarcinoma）、SW480 SW48021, 22；レーン7は、肺癌（lung carcinoma）、A549；レーン8は、骨髄腫（melanoma）、G361である。また陽性コントロールとして、ベータアクチン遺伝子を用いたノーザンブロット解析の結果を下に示す。

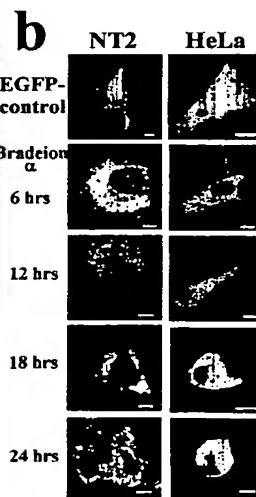
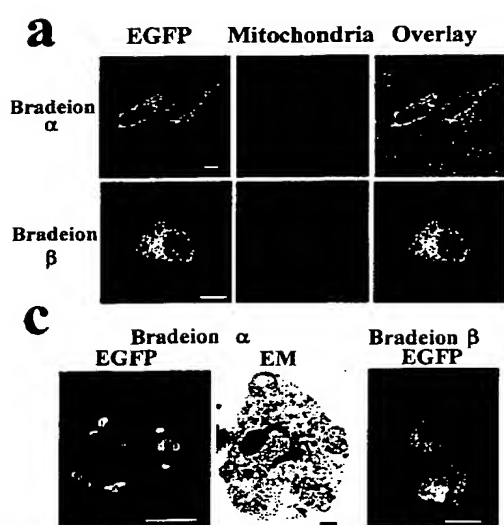
【図3b】この図は、大腸癌患者検体におけるブラディオン遺伝子の癌特異的発現を示す。RT-PCR法、insituハイブリダイゼーション法による大腸癌（T1～T10）、皮膚癌（T11～T13）、正常細胞（N1～N2）におけるブラディオン遺伝子発現の測定結果を示す。図中、*は、 α 及び β ブラディオン遺伝子双方が検出され、遺伝子内変異は見られなかった場合であり、NDは、RNAの変質により検出不能であったことを示し、Ad（well）は、アデノカルシノーマ（分化型）を示し、Ad（mod）は、アデノカルシノーマ（中度分化型）を示し、Mucは、ムチン分泌型アデノカルシノーマを示し、MMは、悪性黒色腫を示す。K-ras遺伝子のコドン12の標準遺伝子配列はGGTであるが、その遺伝子内変異をもつものを記載した。この突然変異は染色体1対のうち片方で生じたものである。

【図3c】この図は、ヒト癌組織検体のinsituハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。図3bにおけるT13、T8についての組織染色図（Antisense：陽性、Sense：陰性対照）を示す。

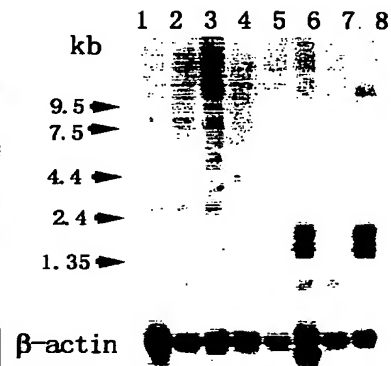
【図1a】



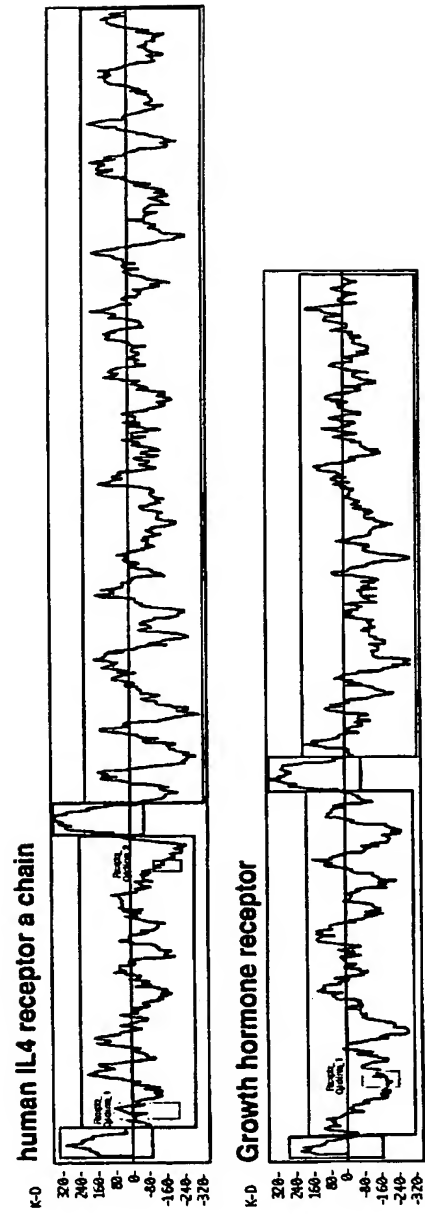
【図2】



【図3a】



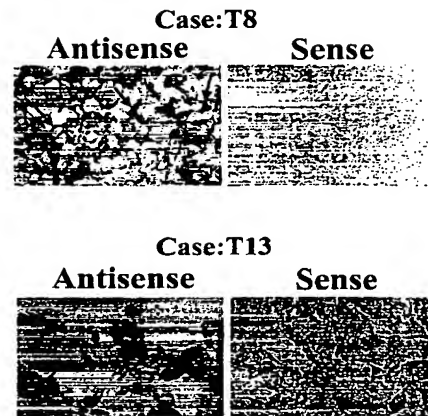
【図1b】



【図 3 b】

Case No.	Age/sex	Hist. type	Dukes' stage	K-ras (codon 12)	Bradford	<i>In situ</i> RT-PCR hybridization
T1	81/M	Ad(mod)	A	-	ND	+
T2	51/F	Ad(mod)	B	-	ND	+
T3	71/M	Ad(mod)	C	-	+	+
T4	70/M	Ad(mod)	C	-	ND	+
T5	40/M	Ad(mod)	C	-	ND	+
T6	75/M	Ad(mod)	A	-	ND	+
T7	71/F	Ad(well)	B	GTT	+	+
T8	56/M	Ad(well)	B	-	ND	+
T9	70/F	Ad(well)	C	GGT	+	+
T10	54/M	Ad(well)	C	GAT	ND	+
T11	73/F	MM	A	-	ND	+
T12	63/M	Muc	A	-	+	+
T13	68/F	Muc	C	GAT	+	+
N1	54/M	normal	-	-	-	-
N2	81/M	normal	-	-	-	-

【図 3 c】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マ-ト*(参考)

// C 0 7 K 14/715

C 0 7 K 16/28

16/28

C 1 2 P 21/08

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00

Z N A A

Characterization of Tissue- and Cell-Type-Specific Expression of a Novel Human Septin Family Gene, *Bradeion*

Manami Tanaka,^{*1,2} Tomoo Tanaka,^{*†1} Hiroshi Kijima,^{*†} Johbu Itoh,[†]
Taroh Matsuda,^{*} Sadaaki Hori,[†] and Miyuki Yamamoto^{*‡}

^{*}Department of Collaborations, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Building Tsukuba Central 6, Higashi, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8566, Japan; [†]Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan; and [‡]Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8575, Japan

Received July 20, 2001

Expression changes in subsets of genes occur in the course of altering cell fates, i.e., aging, cell death, and carcinogenesis. These changes simultaneously provide the good candidate as a biomarker for monitoring cancer. We have identified a novel human septin family gene, *Bradeion*, from adult brain cDNA library by a monoclonal antibody CE5. Northern blot and *in situ* hybridization analysis showed that *Bradeion* has two distinct transcripts, approximately 2.2 and 1.7 kb length (α and β , respectively) mainly in brain and slightly in heart, and no expression in any fetal organs. Haplotype analysis placed the gene location at 17q23. The gene contains GTPase motifs highly conserved in the septin family genes that are essential for cytokinesis and cell separation. The transcript of β form lacks a hydrophobic region, which suggests that this form arises from a single *Bradeion* gene through unique RNA splicing. Interestingly, this brain-specific *Bradeion* gene is also expressed in two human cancers, colorectal cancer and malignant melanoma. Ectopic expression of normal *Bradeion* α and β transcripts were confirmed both in patients' tumor samples and in *in vitro* cultured human cancer cell lines. Thus the *Bradeion* provides valuable tools as a tumor-specific and selective marker. © 2001 Academic Press

Key Words: *Bradeion*; CE5; septin family gene; ATP binding GTPase; colorectal cancer.

The following full-length nucleotide sequences have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank DNA databases with the Accession No. AB010642 (5' upstream of *Bradeion* α), AB002110 (full-length *Bradeion* α), and AB008753 (*Bradeion* β).

¹ The first two authors contributed equally to this work.

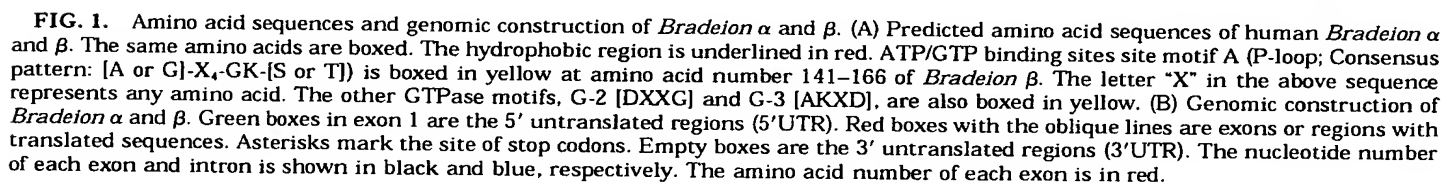
² To whom correspondence should be addressed. Fax: +81-298-61-6046. E-mail: tanaka-manami@aist.go.jp.

The brain expresses more of the total genetic information encoded in DNA than does any other organ in the body (2). Up to 50,000 distinct mRNA sequences are thought to be expressed, 10–20 times more than in the kidney or liver. Recent efforts in genomics research have identified a large number of cDNA sequences encoding orphan receptors and signaling molecules (3–5). However, many neuron-specific genes still remain uncharacterized. One strategy for characterizing such unknown genes is to use antibodies and/or cDNA fragments such as ESTs as probes to detect proteins or transcripts which show brain-specific expression.

An IgM λ class monoclonal antibody CE5 raised against membranes from rat dorsal root ganglia defines an antigenic determinant expressed by subpopulations of mammalian central and peripheral neurons (1). CE5 immunoreactivity was observed throughout the nervous system especially in the Purkinje cells in the cerebellar cortex. Some CE5-positive populations of neurons degenerate in Chagas' disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (6), that also expresses CE5 reactive epitopes, suggesting an autoimmune basis of this disease. However, neither the molecular structure nor function of the neuronal CE5 antigen have been characterized so far.

The screening of an expressed human adult brain cDNA library with CE5 yielded many cDNA clones, and those clones were also screened for brain and/or heart specific expression by Northern blot hybridization. As one of the genes showed brain and heart specific expression pattern, it was further analysed by sequencing.

Here we report the initial biochemical and biological characterization of two transcripts of a novel gene *Bradeion*. The molecular structure indicates that the gene belongs to human septin family genes, and that, be-



(Life Technologies, MD) (10). For first strand cDNA synthesis, the primer (GSP1) GCTGTGTGTGCTGGCTTCC was used. For PCR, the abridged anchor primer (AAP) provided by the company was used as a "forward primer" and 5'-GCTCCTTTCCTTTCCTTT-3' was used as the following specific "reverse primer" (GSP-2). Marathon cDNA Amplification Kit (Clontech, CA) was also used for confirmation of the data.

Northern blot analysis. 32 P-labeling of a cDNA clone containing full-length *Bradeion α* was done by random primer extension (TaKaRa Shuzo, Tokyo). Hybridization with multiple tissue Northern blots (Clontech, CA) was performed as described (11).

Tissue in situ hybridization. Bradeion β RNA probes were synthesized with T7 RNA polymerase and SP6 RNA polymerase in DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics). *In situ* hybridization to dissected human tumor regions was performed as described (12).

Clinical samples. Human colorectal cancer specimens were obtained with informed consent at surgical resection. Normal intestinal tissues were also obtained at the tumor resection. Tissues were rapidly frozen and stored at -80°C until analysis.

Detection of Bradeion genes from the tissues of colorectal cancer patients by RT-PCR. Total cellular RNA and genomic DNA were isolated from the cultured cell lines and from the tumor tissues using

TABLE 1
Exon/Intron Characteristics of the Human *Bradeion* Gene

Exon	Exon size (bases)	5'-splice site GURAGU ^a	Intron size (bases)	3'-splice site (Y) _N -NCAG ^a
<i>Bradeion</i> α				
1	156	GUAAGG	2,136	CUUCCCCCAG
2	759	GUAAAA	438	UCCUCUCUCCUCUCAG
3	87	GUAAGG	493	UUUCCCCUUUCUCCAG
4	124	GUAUGU	2,976	CCCCAG
5	135	GUAUGG	113	UUCCCCAG
6	118	GUGAGG	89	UCAG
7	102	GUGGGG	194	CCUCUUCAG
8	97	GUAAAG	93	UGCAG
9	418	GUGAGA	257	UUCCAG
10	229	UGUCCC		
<i>Bradeion</i> β				
2a	297	GUAGAG	368	CUAG
2b	93			
9a	163	GUAUGA	155	CCCUUUUCUCCCUUUAG
9b	100			

Note. The nucleotides in red mean the match of GU-AG consensus, and those in blue mean the match of the consensus sequence of the splice sites. The nucleotides in black color don't conform to the consensus sequence of the splice sites. R: A or G. Y: C or U.

^a Consensus sequences of splicing junctions.

GIBCO/BRL TRIzol reagent (Life Technologies, MD). For RT-PCR of both *Bradeion* genes, reverse transcription of 5 μ g total RNA was primed at 45°C for 30 min using SUPERSCRIPT One-Step RT-PCR System (Life Technologies, MD), and the reaction mixture was directly used for PCR. Four primer pairs were used for the PCR amplification: forward primer-1: nucleotides 305–321 of *Bradeion* α clone, reverse primer-1: nucleotides 1993–2012; forward primer-2: nucleotides 16–35, reverse primer-2: nucleotides 354–335; forward primer-3: nucleotides 214–233, reverse primer-3: nucleotides 1284–1265; forward primer-4: nucleotides 1057–1077, reverse primer-4: nucleotides 2150–2131. PCR was performed using 40 cycles of 94°C (15 s), 55 or 60°C (30 s), and 72°C (1 min). The RT-PCR products were subject to the gel electrophoresis in a 12.5% GeneGel by GenePhor system (Amersham Pharmacia Biotech). The sequences of the RT-PCR products were confirmed by direct sequencing.

Cytogenic and FISH analysis. Fluorescence *in situ* hybridization studies were carried out by standard techniques (12). Human and mouse BAC library screening, and FISH analysis were performed by Genome Systems, Inc., MO.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and Characterization of a Novel Human Septin Gene Family *Bradeion*

We obtained a number of cDNA clones of human adult brain and heart cDNA libraries using immunoscreening by monoclonal antibody CE5. Positive clones were sequenced and screened by Northern blot analysis for brain- and heart-specific expression according to the characteristics of the reaction of CE5 to mammalian tissues (1). Among them, CE5-Brain3 clone had a significant tissue-specific expression. Complete sequencing of the CE5-Brain3 (CE5B3) clone (2,225 bp, DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. AB002110) re-

vealed that it contained one open reading frame of 627 bases in length with 96 bases of a 5' noncoding sequence and 1,502 bases of a 3' noncoding sequence. The sequence around the 5'-most ATG codon of the CE5-Brain3 clone conformed to Kozak's rules (13). The open reading frame starting with this ATG encodes a 208-residue polypeptide (Fig. 1A). With GeneTrapper positive selection and RACE, we also found other clone with 123 bases at 5' end upper to CE5B3 clone (DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. AB010642).

The GeneTrapper positive selection and the sequence screening of over 150 clones resulted in another transcript form of CE5B3 gene, CE5-Brain3-GT8 (CE5B3-GT8) (DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. AB008753). Marathon cDNA amplification (Clontech) also confirmed that there are indeed two separate transcripts using human brain poly(A)⁺ RNA. The open reading frame of CE5B3-GT8 encodes a putative 478-residue polypeptide (Fig. 1A). Comparison between CE5-Brain3 and CE5B3-GT8 revealed that CE5B3 is made by insertions in the exon 2 (368 bases) and 9 (155 bases) of CE5B3-GT8 (Fig. 1B).

We named this gene *BRADEION*: SLOW TIME, since it is mainly and uniquely expressed in human adult neurons; long-term survival cells without any division and differentiation. We hereafter called the CE5B3 gene as *Bradeion* α , and CE5B3-GT8 as *Bradeion* β , respectively.

Bradeion β contained a remarkable "ATP/GTP-binding sites" (consensus pattern: [A or G]-X₄-GK-[S or T]) at amino acid number 151–158 (Fig. 1A), which is a consensus motif found in GTPases (14, 15). *Bradeion* β

has three GTPase motifs (Fig. 1A, highlighted in yellow), and these regions are highly conserved in the septin family code proteins with GTPase activity thought to interact during cytokinesis and cell separation. The amino acid homology ratio of *Bradeion* β to the representative human septin family genes is as follows; 59% to CDCrel-1 (16), 44% to *Nedd5* (17), 37% to CDC10 (18), 41% to *Diff6* (19). *Bradeion* genes thus both belong to a novel human septin family, with a longest size and with a significant tissue-specific expression. Secondary structure prediction indicated a possible α -helix (15) near the carboxyl terminus of *Bradeion* β . This region contains an interrupted leucine/isoleucine repeat at every seventh amino acid residue, which may form a coiled-coil structure as suggested in most of the other septins (marked by * in Fig. 1A).

The manner of deletion (splicing) in *Bradeion* α was slightly different from the usual alternative splicing (20–23), where the exon is added or deleted. Although alternative splicing occurs in different tissues during development, the two *Bradeion* proteins are expressed in normal tissues at the same stage of development. The initial 119 amino acids are identified in both *Bradeion* α and β (Fig. 1A). Due to the deletion of 368 nucleotides in exon 2, the frameshift of the amino acid sequences changed. Because the stop codon of the *Bradeion* α gene is located in exon 2, the amino acid sequence of *Bradeion* α is shorter than *Bradeion* β . Analysis of the 23 splice sites of *Bradeion* α and β listed in Table 1 showed that all, except one exception, conformed to the GU-AG rule (24, 25). The segment deleted from within exon of the *Bradeion* α gene (yielding exon 2a and 2b of *Bradeion* β) contained the repetitive nucleotide and amino acid sequences, (TG)₁₉ + TT + (TG)₆ + (CV)₆ + CL + (CV)₂. The deleted segment also contained the hydrophobic sequence of amino acid No. 141–146.

Tissue-Specific and Cell-Type Specific Expression of *Bradeion* Gene

The immunocytochemical examination using monoclonal antibody CE5 only reacted with the brain and heart, as described previously (1). Developmental expression pattern and cell-type analysis revealed that two distinct transcripts, approximately 2.2 and 1.7 kb in length (α and β , respectively), are mainly or uniquely abundant in adult neurons, and also a few in heart. The expression was downregulated in human fetal organs (Fig. 2). The intensity of the bands in brain was approximately 10 (*Bradeion* α : 2.2 kb in length) to 1 (*Bradeion* β : 1.7 kb).

The cytogenetic location of human *Bradeion* genes are 17q23, between STS markers D17S792 and D17S944. Mouse *Bradeion* gene locates at a position 63% of the distance from the heterochromatic-euchromatic boundary to the telomere of chromosome 11, an area that corresponds to band 11C (data not

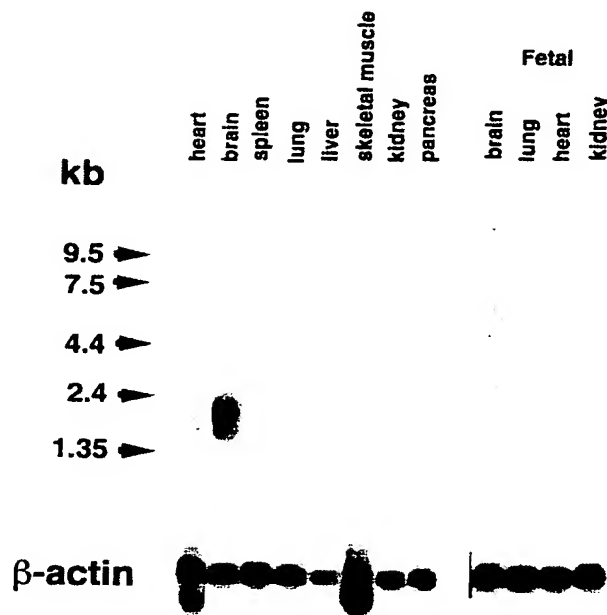


FIG. 2. Tissue distribution of *Bradeion* mRNAs. Membranes containing 2 μ g/lane of polyadenylated RNA from indicated human tissues (MTN Blots, Clontech, 7760-1 for adult tissues, 7756-1 for fetal organs) were hybridized with a ³²P-labeled whole region of human *Bradeion* α cDNA. Results of hybridization with a β actin probe are shown below.

shown). Interestingly, the location at chromosome 17q23 raises the possibility that *Bradeion* may be a candidate gene for a group of neurodegenerative disorders comparable to the prepro-orexin gene; a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors (5).

In situ hybridization of adult mouse brain was also performed. As predicted by the CE5 reaction, most intensely labeling was observed in the cytoplasm and nuclei of Purkinje cells (Figs. 3E and 3F) in the cerebellar cortex (Fig. 3A), the hippocampus (Fig. 3C), and the motor nucleus of the VIIth nerve. The controls either with a sense probe, or without a probe showed no staining (Figs. 3B and 3D).

Bradeion Specifically Expressed in Human Colorectal Cancer with No Point Mutations

The further expression screening of *Bradeion* using various human cell lines provided remarkable evidence that two human cancer cell lines, SW480 (colorectal adenocarcinoma) and G361 (malignant melanoma) were positive of both *Bradeion* α and β with equal intensity (Fig. 4A). Northern blot analysis (MTN blots, 7766-1, Clontech) confirmed the absence of the expression in normal colon and small intestine (data not shown). Neither point mutation nor nucleotide change of *Bradeion* genes was detected by the analysis of RT-

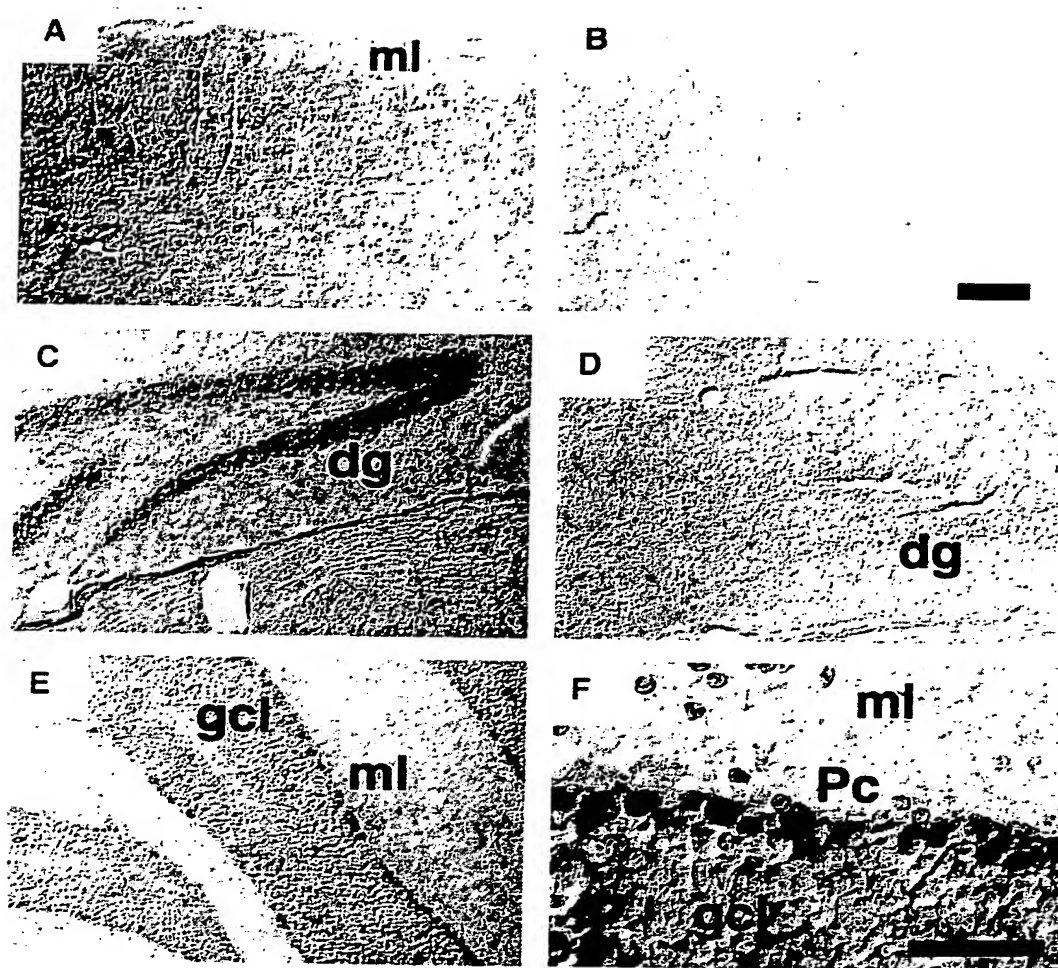


FIG. 3. *In situ* hybridization by *Bradeion* β mRNA probe on adult mouse brain sections. A, C, E, and F are reacted with antisense probe, and B and D are reacted with sense probe. (A, B) The cerebral cortex; ml, molecular layer. (C, D) The dentate gyrus (dg), granule cells are heavily labeled. (E, F) The cerebellar cortex. F shows higher magnification to reveal Purkinje cell staining. ml, molecular layer; gcl, granule cell layer; Pc, Purkinje cells. Scale bar in B is 100 μ m, and is applied for A, B, C, D, and E. Scale bar in F is also 100 μ m.

PCR and direct sequencing in both cell lines (data not shown).

It is known that the SW480 cell line has point mutations of the *K-ras* at codon 12, which activates its p21 oncogene products (26, 27). This activation is thought to alter the cellular signal transduction pathways and to affect nepotistic growth of cancers (28, 29). The association of *K-ras* mutations with *Bradeion* expression in SW480 cell line with wild-type p53 (30, 31) drew our attention to whether or not this association is observed in patients' tumor samples.

We screened dissected cancer samples from the patients of colorectal adenocarcinoma for *Bradeion* expression. The samples used were colorectal carcinoma including mucinous carcinoma and rectal malignant melanoma, with comparison to the samples from lung adenocarcinoma, stomach cancer, and normal tissues. The possible point mutations in *K-ras*

oncoprotein in the same samples were also examined. Figure 4B summarizes the pathological and molecular analyses of patients' specimens. About 30% of the cancer tissues were associated with *K-ras* point mutations at codon 12, which is equivalent with the reported incidence in colorectal cancer in Japanese patient population (Kijima, unpublished data). RT-PCR detection of the transcripts were further performed, however, because of degradation five out of 13 samples were so far used in the present study (Fig. 4B). There was no *Bradeion* expression in the normal tissue from the patients, and more importantly, there were no point mutations detected in both *Bradeion* α and β transcripts in patients' samples, which was the case in SW480 and G361 cell lines as well.

Figure 4C demonstrates typical *in situ* hybridization signals in patients' samples. These signals confirmed

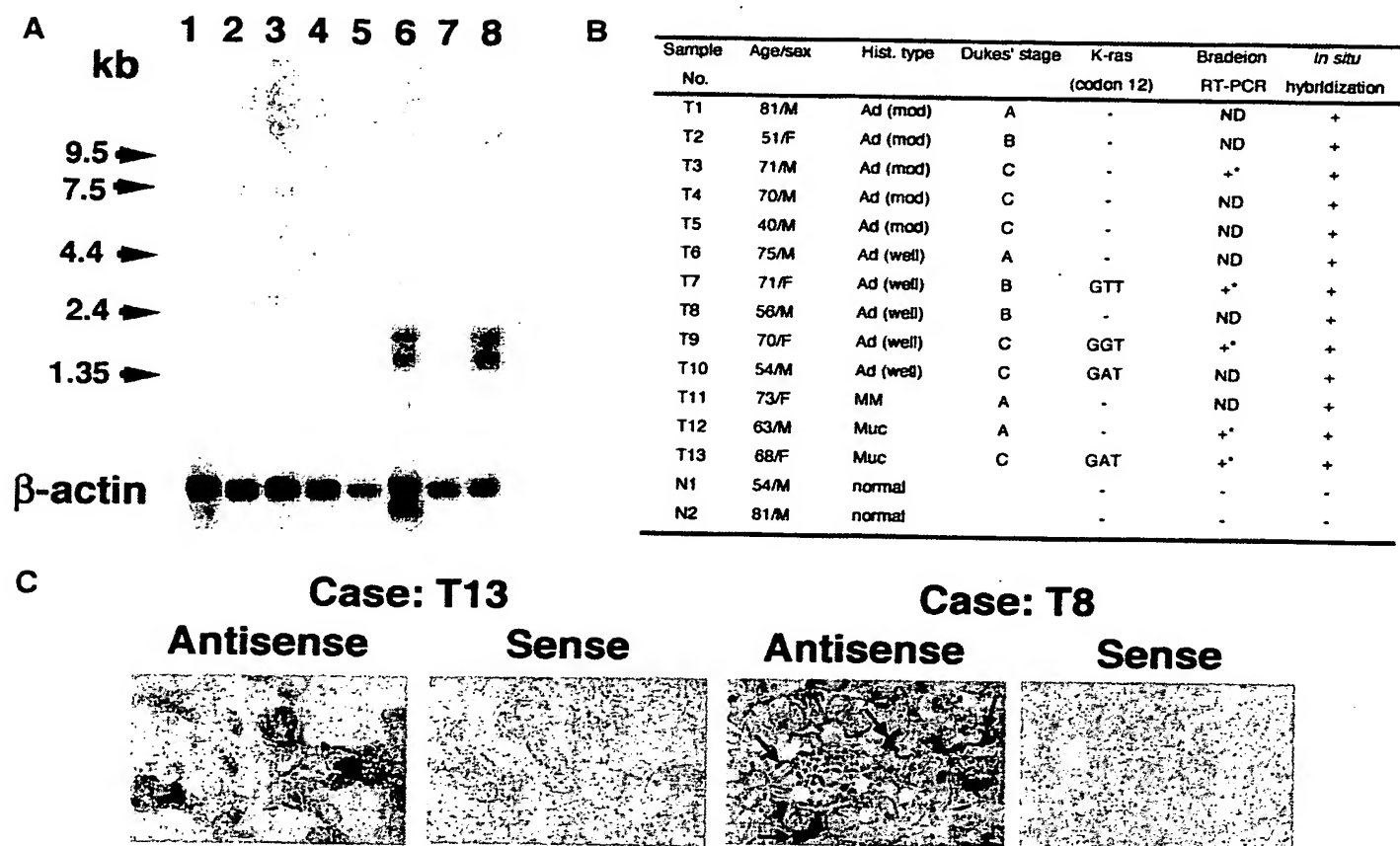


FIG. 4. Tumor-specific expression of *Bradeion* α and β . (A) Equal expression of *Bradeion* α and β mRNAs in human cancer cell lines. Northern blot analysis (MTN Blots, Clontech, 7757-1 for human cancer cell lines) was hybridized with a 32 P-labeled whole region of human *Bradeion* α cDNA. Lane 1, Polymyelocytic leukemia, HL-60; lane 2, HeLa S3; lane 3, chronic myelogenous leukemia, K-562; lane 4, lymphoblastic leukemia, MOLT-4; lane 5, Burkitt's Lymphoma, Raji; lane 6, colorectal adenocarcinoma, SW480; lane 7, lung carcinoma, A549; lane 8, melanoma, G361. Results of hybridization with a β actin probe are shown below. (B) Clinical manifestations of colorectal adenocarcinoma patients. ND, not determined. * Both *Bradeion* α and β were detected, and no point mutation was found in PCR products. Ad (mod), moderately differentiated adenocarcinoma; Ad (well), well differentiated adenocarcinoma; Muc, mucinous carcinoma; MM, malignant melanoma. Codon 12 wild type sequence of human K-ras gene is GGT. All four mutation cases are heterozygous. (C) Tissue *in situ* hybridization of tumor samples.

that the gene expression were detected only in the cytoplasm, and at a lower frequency (about 30% of samples), in the nucleus of tumor cells. There is no labeling in normal cells and tissues in the section, nor with sense probe. Such ectopic expression of *Bradeion* has never been observed in the samples of lung adenocarcinoma and stomach cancer (data not shown). Thus *Bradeion* provides a good indicator of colorectal cancer, and RT-PCR can detect microcontamination of the metastatic cells in the samples. These results indicated that the expression is in "all or none" pattern, with a specificity of cell types, and without any point mutation at the nucleotide level.

Although the molecular structure of *Bradeion* gene indicates that it might be related to the regulation of cell growth, it requires further investigation to clarify the putative ligands and second messenger systems

activated via *Bradeion*. The function of *Bradeion* in the nervous system is also yet to be defined. Septins are GTPases required for the completion of cytokinesis in diverse organisms, yet their roles in cytokinesis or other cellular processes remain unknown. The data related to the other septin proteins, *CDCrel-1* and *Nedd5*, suggest that septins may regulate vesicle dynamics through interactions with syntaxin in the nervous system (32). *Bradeion* may also have different functions in neurons, relating to these other septin family proteins.

It is clear, however, that the data demonstrated here clearly highlight the clinical importance of the *Bradeion* gene as a tumor-specific marker. Further clinical investigations may provide a novel strategy for diagnosis, novel therapeutics, and gene therapy targets of colorectal cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Takao Murakami, University of Gumma, for naming "Bradeion"; Ms. Akira Togiya of Takara Shuzo, Co., Ltd., Tokyo, for sequence service; Dr. Wu-Bo Li of Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland; Dr. J.-E. Ikeda, Tokai University, for valuable discussions and technical advice; and Dr. Kenji Sekikawa, National Institute of Animal Health, and Dr. Shinji Hadano, University of British Columbia, Canada, for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from NIBH, NAIR, STA (COE), Tokai University and Ministry of Education, Science, and Culture, Japan.

REFERENCES

- Wood, J. N., Hudson, L., Jessell, T. M., and Yamamoto, M. (1982) A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature* **296**, 34–38.
- Schwartz, J. H. (1991) Synthesis and trafficking of neuronal proteins. In *Principles of Neural Science* (Kandel, E. R., Schwartz, J. H., and Jessell, T. M., Eds.), pp. 49–65, Appleton & Lange, Norwalk, CA.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–1351.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., et al. (1998) Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G-protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**, 573–585.
- Dusanic, D. G. (1991) *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. In *Parasitic Protozoa* (Kreier, J. P., and Baker, J. R., Eds.), 2nd ed., pp. 137–194, Academic Press, San Diego, CA.
- Li, W. B., Gruber, C. E., Lin, J. J., Lim, R., D'Alessio, J. M., and Jessee, J. A. (1994) The isolation of differentially expressed genes in fibroblast growth factor stimulated BC3H1 cells by subtractive hybridization. *BioTechniques* **16**, 722–729.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Bairoch, A., Bucher, P., and Hofmann, K. (1997) The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Res.* **25**, 217–221.
- Frohman, M. A. (1993) Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol.* **218**, 340–356.
- Tanaka, M., Tanaka, T., Harata, M., Suzuki, T., and Mitsui, Y. (1998) Triplet repeat-containing ribosomal protein L14 gene in immortalized human endothelial cell line (t-HUE4). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 531–537, doi:10.1006/bbrc.1998.8125.
- Shi, Y. P., Mohapatra, G., Miller, J., Hanahan, D., Lander, E., Gold, P., Pinkel, D., and Gray, J. (1997) FISH probes for mouse chromosome identification. *Genomics* **45**, 42–47.
- Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125–8148.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., and Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945–951.
- Linder, P., Lasko, P. F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P. J., Nishi, K., Schnier, J., and Slonimski, P. P. (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* **337**, 121–122.
- Yagi, M., Zieger, B., Roth, G. J., and Ware, J. (1998) Structure and expression of the human septin gene HCDCREL-1. *Gene* **212**, 229–236.
- Kinoshita, M., Kumar, S., Mizoguchi, A., Ide, C., Kinoshita, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., and Noda, M. (1997) Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev.* **11**, 1535–1547.
- Nakatsuru, S., Sudo, K., and Nakamura, Y. (1994) Molecular cloning of a novel human cDNA homologous to CDC10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 82–87, doi:10.1006/bbrc.1994.1896.
- Mori, T., Miura, K., Fujiwara, T., Shin, S., Inazawa, J., and Nakamura, Y. (1996) Isolation and mapping of a human gene (DIFF6) homologous to yeast CDC3, CDC10, CDC11, and CDC12, and mouse Diff6. *Cytogenet. Cell Genet.* **73**, 224–227.
- Breitbart, R. E., and Nadal-Ginard, B. (1987) Developmentally induced, muscle-specific trans factors control the differential splicing of alternative and constitutive troponin T exons. *Cell* **49**, 793–803.
- Boggs, R. T., Gregor, P., Idriss, S., Belote, J. M., and McKeown, M. (1987) Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the transformer gene. *Cell* **50**, 739–747.
- Eperon, L. P., Estibeiro, J. P., and Eperon, I. C. (1986) The role of nucleotide sequences in splice site selection in eukaryotic pre-messenger RNA. *Nature* **324**, 280–282.
- van-Santen, V. L., and Spritz, R. A. (1986) Alternative splicing of SV40 early pre-mRNA *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **14**, 9911–9926.
- Breathnach, R., and Chambon, P. (1981) Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349–383.
- Mount, S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.* **10**, 459–472.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **9**, 138–141.
- Vile, R. G., and Morris, A. G. (1992) The multiple molecular mechanisms of cancer: In search of unification. In *Introduction to the Molecular Genetics of Cancer* (Vile, R. G., Ed.), pp. 1–32, Wiley, Chichester.
- Fearon, R. A., and Jones, P. A. (1992) Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J.* **6**, 2783–2790.
- Vile, R. G., and Diaz, R. M. (1998) Gene Therapy. In *ICRF Handbook of Genome Analysis* (Spurr, N. K., Young, B. D., and Bryant, S. P., Eds.), pp. 649–666, Blackwell Science, Oxford.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359**, 235–237.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B. 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C., and Mabry, N. D. (1976) Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* **36**, 4562–4569.
- Beites, C. L., Xie, H., Bowser, R., and Trimble, W. S. (1999) The septin *CDCrel-1* binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nature Neurosci.* **2**, 434–439.

Impaired expression of a human septin family gene *Bradeion* inhibits the growth and tumorigenesis of colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*

Manami Tanaka,¹ Hiroshi Kijima,^{1,2} Johbu Itoh,² Taroh Matsuda,¹ and Tomoo Tanaka^{1,2}

¹Department of Collaborations, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Higashi, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8566, Japan; and ²Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan.

We have identified a novel human septin family gene *Bradeion*, which is specifically expressed in human colorectal cancer and malignant melanoma. In order to analyze the implications of tumor-specific gene expression, ribozymes and its derivatives were specifically designed and transfected into various colorectal adenocarcinoma cell lines for *Bradeion* inactivation. We constructed ribozyme expression plasmids controlled by a human tRNA^{Val} promoter, and both hammerhead ribozyme and its allosteric derivative maxizyme were used for two different forms of *Bradeion* mRNA. The sequence-specific cleavage of *Bradeion* mRNA resulted in significant growth inhibition and G2 arrest in human cancer cell lines, detected by flow cytometry analysis. In addition, *in vivo* mice studies demonstrated marked tumor growth suppression by the *Bradeion*-specific ribozymes. Thus, the tumor-specific and selective marker *Bradeion* also provides valuable tools as a potential target for colorectal cancer therapy.

Cancer Gene Therapy (2002) 9, 483–488 doi:10.1038/sj.cgt.7700460

Keywords: *Bradeion*; septin family genes; cytokinesis; antisense ribozyme; G2 arrest

Colorectal tumorigenesis is commonly believed to involve typically about five genetic mutations (or hits) of both proto-oncogenes (such as *ras*) and tumor-suppressor genes (such as *p53*, *DCC*, and *APC*).^{2,3} Therefore, it is far from obvious which of these genetic defects should be targeted for correction in a gene therapy approach. It also seems improbable that, even if a single mutation could be corrected in every tumor cell, the malignant phenotype would necessarily be reversed because the evolution of malignancy in human tumors is a multicomponent event.² Therefore, desired gene targets for the monitoring and controlling of cancer might have the following features: (a) selectivity of cell types, (b) specificity (“all or none” type expression changes), and, more importantly, (c) neither any amino acid nor structural change caused by point mutations, deletions, missense mutation, *etc.*, in the course of phenotype change. Currently, there have been reported few genes or proteins that satisfy these categories, and it is supposed that these candidate genes do not have to be closely involved in the process of tumorigenicity. For example, most of the target molecules of anticancer drugs and the common tumor markers are not specifically oncogene products nor molecular chaperones related to the process of carcinogenesis.

We have initiated an approach to identify and characterize key molecules described above and, for this purpose, constructed cDNA libraries from senescent and immortal cells.⁴ Human brain and heart cDNA libraries were also used to identify the novel molecules related to cell cycle regulation and termination. Through these processes, we have identified a variety of novel genes, and one of these is *Bradeion*.¹ The *Bradeion* gene belongs to the mammalian septin family genes,⁵ and originally was discovered from human brain cDNA by expression screening using the monoclonal antibody CES.⁶ Interestingly, *Bradeion* is expressed specifically in two human cancers, colorectal cancer and malignant melanoma, with “all or none” expression profile and no point mutations.¹ These characteristics indicate that normal function of *Bradeion* is likely required for necessary functions of colorectal adenocarcinoma cells and that *Bradeion* may be a useful target for therapy.

We have then proceeded to develop efficient *Bradeion* gene-inactivating agents using antisense ribozymes.^{7–9} We have demonstrated that ribozymes targeting *Bradeion* transcripts are capable of specific-cleaving its target *in vitro*, and stable transfectants of ribozyme-transformed colorectal adenocarcinoma cells exhibited reduced cell growth and G2 arrest. The present study thus extends the utility of these hammerhead ribozymes and its derivative tools based on the function of *Bradeion* for target validation in monitoring and controlling the colorectal cancer *in vivo*. It is emphasized that a novel gene *Bradeion* provides a practical tool to target the colorectal cancer by disruption of cell proliferation and cell cycle regulation.

Received February 11, 2002.

Address correspondence and reprint requests to: Dr Manami Tanaka, Department of Collaborations, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Building Tsukuba Central 6, Higashi, Tsukuba Science City, Ibaraki 305-8566, Japan. E-mail: tanaka-manami@aist.go.jp
Manami Tanaka and Hiroshi Kijima contributed equally to this work.

Materials and methods

Design of tRNA^{Val}-embedded ribozymes

Ribozymes used in the present study were constructed according to the methods as described.⁹⁻¹¹ The target sequences of these ribozymes specific for *Bradeion* α mRNA are the following: Brad- α 1: nucleotides 569–583 of *Bradeion* α clone; Brad- α 2: nucleotides 588–602; Brad- α 3: nucleotides 595–609; Brad- α 4: nucleotides 699–713. The target sequences of the ribozyme specific for *Bradeion* β mRNA are the following: Brad- β 1: nucleotides 108–122 of *Bradeion* β clone; Brad- β 2: nucleotides 157–171; Brad- β 3: nucleotides 304–318; Brad- β 4: nucleotides 378–392.

Cells, transfection, and cell cycle analysis

Human colorectal adenocarcinoma cell lines (SW480, COLO201, DLD-1, HT-29, LoVo, LS174T, SK-CO-1, SW620, SW948, SW1417) were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) and cultured in the media recommended for each cell line.^{3,12} The cell lines used as negative controls were HeLa and K562 cells lines — the same cell lines which appear in the MTN[®] blots provided by Clontech (Palo Alto, CA).¹ After the serial gene expression analysis of those cell lines, SW480 was chosen for further transfection experiments. SW480 was cultured in Leibovitz' L-15 medium supplemented with 10% fetal bovine serum.¹²

Transfections were carried out with the SuperFect Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA), as recommended by the manufacturer. Ribozyme-transfected cells were selected by incubation with G418, and ribozyme derivatives-transfected cells were selected with G418 (500 μ g/mL media) and hygromycin B (250 μ g/mL media) (Invitrogen, Carlsbad, CA) for more than 4 weeks. As controls, inactive ribozymes and derivatives were transfected and selected as described above. The doubling time of each cell line was examined and determined as described.^{8,9} For flow cytometry analysis, cells were pelleted and resuspended in 1 mL of PBS containing 2 μ g/mL RNase and 50 mg/mL propidium iodide, and incubated for more than 30 minutes at 37°C. The profile of cells in the G0/G1, S, and G2/M phases of the cell cycle was analyzed by using EPICS ELITE ESP (Beckman Instruments, Fullerton, CA) according to the instructions by manufacturers.

Detection of *Bradeion* genes by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total cellular RNA was isolated from the cultured cell lines using Gibco/BRL TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). For RT-PCR of both *Bradeion* genes, RT of 5 μ g of total RNA was primed at 45°C for 30 minutes using SuperScript One-Step RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA), and the reaction mixture was directly used for PCR. Four primer pairs were synthesized based on the sequence of *Bradeion* gene¹ and used for PCR amplification. PCR was performed as described previously,¹ and the resulting RT-PCR products were subject to gel electrophoresis in 12.5% GeneGel by GenePhor system (Amersham Biosciences Corp, Piscataway, NJ). The sequences of RT-PCR products were confirmed by direct sequencing.

Growth of colon cancer xenografts in athymic mice

The stable transformants and parental cell line (SW480; 5×10^5 cells) were subcutaneously inoculated into nude mice ($n=10$ for each transformant and the parental cell line, female, 8 weeks, BALB/cA-*nu*; Clea Japan, Tokyo, Japan). The growth rates of the cells were estimated by measuring the size of tumor lesions after inoculation. The size was calculated by the equation, $V=1/2AB^2$, in which A and B are the experimental measurements in millimeters of length and width, respectively. All experiments on laboratory animals were performed in accordance with the care and use guidelines of the Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan.⁸

Results

Design of tRNA^{Val}-driven antisense ribozymes

In order to evaluate the tumor-specific expression of *Bradeion* α and β , we constructed ribozyme expression plasmids controlled by a human tRNA^{Val} promoter, which targeted the *Bradeion* α transcripts. The ribozyme transcripts by this *pol* III-dependent expression system are much higher than that of *pol* II expression system.^{10,11} The target sequences of these ribozymes and maxizymes in *Bradeion* α mRNA are shown in Figure 1, A and B, and selected cleavage sites are indicated by black boxes.

As for targeting of *Bradeion* β , it was not possible to cleave by the conventional ribozyme specifically the *Bradeion* β mRNA without damaging the *Bradeion* α mRNA. Therefore, we utilized the recently created "maxizyme," which has an allosterically controllable function.¹¹ This allosteric form consists of two substrate binding arms and catalytic core region, and would have a cleavage activity only when the two substrate binding arms of the maxizyme interact with the *Bradeion* β mRNA. In addition, *pol* III-dependent expression system enables both ribozyme and maxizyme transcripts to be exported to the cytoplasm, which resulted in the presence of ribozymes and their target mRNA within the same cellular compartment. This phenomenon would resemble the changes in conformation of allosteric proteinaceous enzymes that occur in response to their effector molecules. The maxizyme construction with the target candidate sequences in expression plasmids was shown in Figure 1C, and the heterodimeric structure was shown in Figure 1D.

These ribozyme and/or maxizyme expression plasmids were transfected into SW480 cells. This cell line has mutated *p21* and *APC*, and wild-type (WT) *p53*.³ Several independent stable cell lines were generated by G418 (500 μ g/mL media) or hygromycin selection (250 μ g/mL media).

Growth inhibition and disruption of cell division by the cleavage of anti-*Bradeion* mRNA

Bradeion α - and β -specific ribozymes were transfected into the SW480 cells (Fig 1A). Stably transfected SW480 cells that harbored a ribozyme and/or maxizyme were selected by G418 (ribozyme and maxizyme) and hygromycin (maxizyme).^{10,11} A total of 66 independent lines for each mutant (*Bradeion* α single mutant, *Bradeion* β single mutant, and

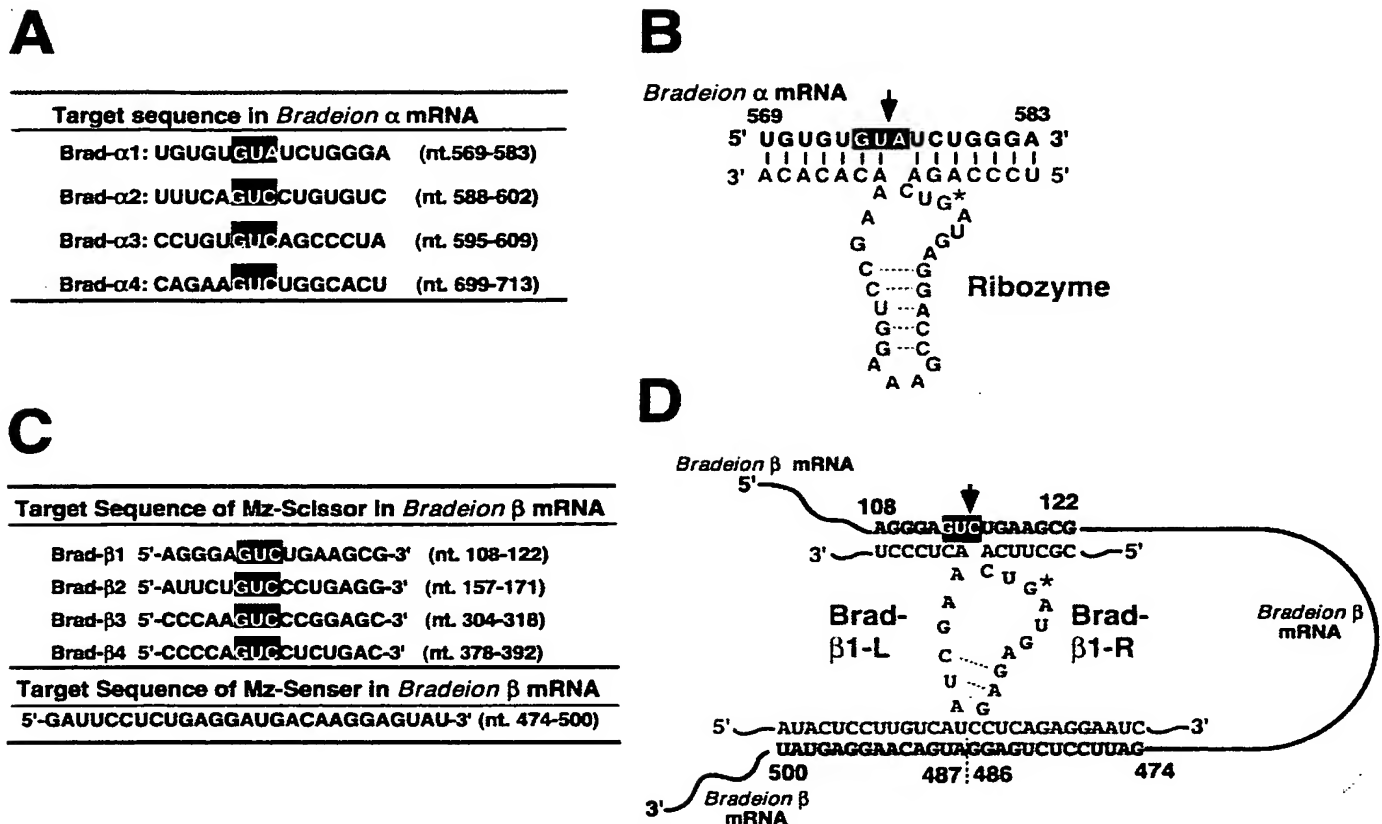


Figure 1 Hammerhead ribozymes and its derivatives, heterodimeric maxizymes, specific for *Bradeion* α and β . **A**: Four candidates of ribozyme-mediated cleavage sites (in black box) in *Bradeion* α mRNA. **B**: Secondary structure of the hammerhead ribozyme specific for *Bradeion* α (example of Brad- α 1). The inactive ribozyme differed from the active ones by replacement of single nucleotide in the catalytic core "G" (the site shown by "****") to "A." **C**: The candidates of target sequences of maxizyme (Mz) scissors and maxizyme sensor in *Bradeion* β mRNA. **D**: The active heterodimeric maxizymes under the control of a human tRNA^{Val} promoter (example of Brad- β 1). The formation of active forms is favored because perfect base pairing occurs only in the case of active complexes. Inactive maxizyme can be made by replacing the nucleotide "G" (shown with "****") with "A."

Bradeion α and β double mutant) were generated by limit dilution method in 96 titer well dishes. Using 47 among 67 selected cell lines, we examined the functional significance of the ribozyme and maxizyme in the regulation of cell cycle and cell division in those selected cell lines. The parameters used were the doubling time, cell cycle analysis, and RT-PCR of *Bradeion* genes.^{8,9} Inactive ribozyme and maxizyme transfected cells were used as controls. Those ribozymes differed from the active ribozymes by a single G5-to-A5 mutation in the catalytic core.

The doubling time of each cell line was 20–24 hours for original SW480 (control), 26 hours for the cells transfected with the inactive ribozyme, average 38 hours for the cells with Brad α ribozymes, average 48 hours in the cells with Brad β ribozymes, 373 or more in the cells with Brad α and β ribozymes.

Typical results obtained in each *Bradeion* α single mutant, *Bradeion* β single mutant, and *Bradeion* α and β double mutant cell lines were shown in Figure 2. The doubling time of each cell line is 20–24 hours for original SW480 (WT; lane 1), 26 (lane 2; cells transfected with the inactive ribozyme), 38 (lane 3; cells with ribozyme Brad- α 3), 48

(lane 4; cells with maxizyme Brad- β 3), 373 or more (lanes 5–9; cells with ribozyme and maxizyme). Figure 2A demonstrates flow cytometry analysis of selected cell lines. The WT cells (lane 1) and cells transfected with inactive ribozyme (lane 2) showed the WT phenotype of cell population in each phase (G0/G1, S, and G2/M), with up to 70% cell population at G0/G1 phase (2n) and 15% at G2/M phase (4n). Cells with inactive maxizymes demonstrated the similar phenotype with normal cell population (unpublished data). In contrast, *Bradeion* α single mutant cells showed irrelevant late S clusters in cell cycle (Fig 2A, lane 3). The same late S clusters were observed in *Bradeion* β single mutant cells, too (Fig 2A, lane 4).

In contrast, the cells with Brad α or β ribozymes showed irrelevant late S clusters in cell cycle (Fig 2B, lanes 3 and 4). The transformants with Brad α and β ribozymes showed significantly different phenotype, with slower cell growth (over 300 hours doubling time compared to 20–24 hours doubling time of control SW480 cells and the cell transfected with inactive ribozyme). Flow cytometry analysis demonstrated 8n peak (8–12% population) with increased cell

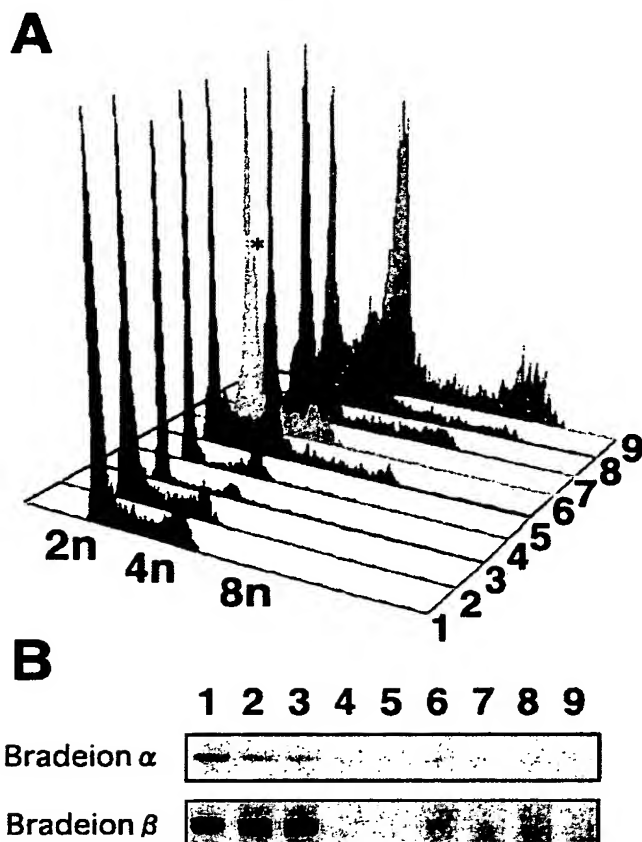


Figure 2 A: G2 growth arrest in colorectal carcinoma cells (SW480) transfected by *Bradeion*-specific ribozymes and maxizymes shown by flow cytometric cell cycle analysis. Cells were stained with propidium iodide to show cell cycle distribution by DNA content. Ten thousand cells were tested in this analysis. G0/G1, S, and G2/M phases of the cell cycle are indicated as 2n and 4n. (1) Control SW480; (2) SW480 cells transfected with an inactive ribozyme; (3) SW480 cells transfected only with *Bradeion* α -specific ribozyme (Brad- α 3); (4) SW480 cells transfected only with *Bradeion* β -specific maxizyme (Brad- β 3); (5-9) SW480 cells transfected with Brad α and β ribozymes (5, Brad- α 3+Brad- β 1; 6, Brad- α 3+Brad- β 2; 7, Brad- α 3+Brad- β 3; 8, Brad- α 4+Brad- β 2; 9, Brad- α 4+Brad- β 3). **B:** RT-PCR analysis of *Bradeion* mRNA of each cell lines described above. PCR products were subjected to electrophoresis in 12.5% GeneGel by GenePhor system (Amersham Biosciences).

population of G2/M phase (lanes 5-9, maximum 68% in lane 9). One of the clones (* in Figure 2A) showed second G1 peak, which indicates the disruption of chromosomes. The cell population in arrested G2/M phase and 8n peak varies slightly among the cell lines of double mutants; however, the phenotype was similar in all double mutant cell lines.

Ribozyme-mediated suppression on *Bradeion* α and β

To examine levels of both *Bradeion* α and β mRNA, we performed RT-PCR analysis. As shown in Figure 2B, the level of *Bradeion* in SW480 cells transfected with ribozymes was drastically lower than in control SW480

cells (lane 1) and/or SW480 cells transfected with inactive ribozyme (lane 2). The level of *Bradeion* β mRNA drastically decreased after maxizyme transfer (lane 4), whereas no alteration was observed by the simple Brad α ribozyme (lane 3). This result indicated that this hammerhead ribozyme cleaved only *Bradeion* α specifically. The other cell lines with maxizyme transfer did not demonstrate significant *Bradeion* β expression by RT-PCR (lanes 5-9).

Interestingly, *Bradeion* α mRNA in the stable transformants so far remained positive in all the clones used in the present study (lanes 3-9). The level of expression varied among clones; however, it could be detected in both *Bradeion* α -specific mutants and double mutants. In double mutant cells (lanes 5-9), both levels of *Bradeion* α and β mRNA were significantly decreased compared with WT (lane 1) and inactive ribozyme expressing SW480 cells (lane 2).

Loss of tumorigenesis shown by ribozyme-transfected cancer cell lines in athymic mice

Heterotrophic transplantation of the SW480 cells as xenografts in athymic nude mice resulted in the rapid development of progressive tumor nodules (Fig 3). *Bradeion*-specific ribozymes significantly suppressed tumor growth of SW480 cells in mice. At 60 days after transplantation, tumors with *Bradeion* α - and β -specific ribozymes were 32.4% and 25.9%, respectively, of the control tumors in a volume. Transfection of both *Bradeion* α and β ribozymes more significantly suppressed tumor growth in the mice system, i.e., tumors with both *Bradeion* α and β ribozymes were 10.5% (Brad- α 3+ β 3) and 4.3% (Brad- α 4+ β 3) compared with the controls in a volume. The results were compatible with those of flow cytometric and RT-PCR analyses (Figures 2B and 3). These results were

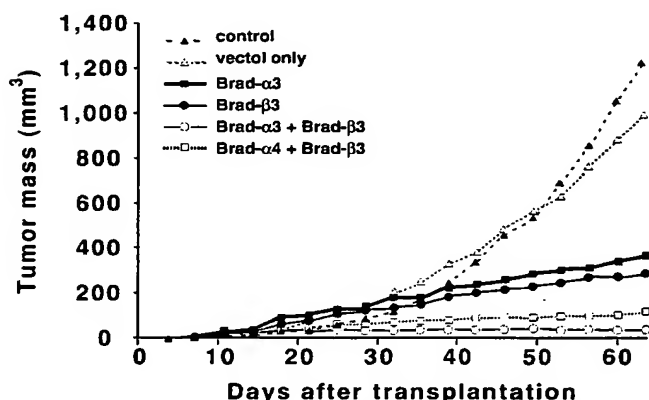


Figure 3 Growth suppression of the SW480 colon adenocarcinoma transplanted in nude mice. *Bradeion*-specific ribozymes significantly suppressed tumor growth of SW480 cells in the mice systems. At 60 days after transplantation, tumors with *Bradeion* α ribozyme (Brad- α 3), *Bradeion* β ribozyme (Brad- β 3), *Bradeion* α + β ribozymes (Brad- α 3+ β 3), and *Bradeion* α + β ribozymes (Brad- α 4+ β 3) were 32.4%, 25.9%, 10.5%, and 4.3%, respectively, compared with the controls in a volume. Tumor volume (mm³) was determined as follows: $1/2 \times \text{length} \times \text{width}^2$.

not observed when the SW480 and other colorectal adenocarcinoma cell lines were used (unpublished data).

Discussion

The results obtained here could point out the essential role of a novel human septin family gene *Bradeion* for the proliferation and growth of colorectal cancer cells. We described the construction of the hammerhead ribozyme specifically targeting *Bradeion* α and β transcripts. This ribozyme expression plasmid controlled by a human tRNA^{Val} promoter, together with the application of its allosteric form "heterodimeric maxizyme," was so far successfully applied and capable of specific-cleaving the target *in vitro* in the present study. Stable transformants expressing the ribozymes altered morphology and reduced cell growth in the cultured cell system. The flow cytometry analysis demonstrated that the transformants with both *Bradeion* α and β ribozymes showed significant growth inhibition by causing G2 arrest. *In vivo* mice studies demonstrated marked tumor growth suppression by the *Bradeion*-specific ribozymes, which was compatible with results of flow cytometric and RT-PCR analyses.

Bradeion belongs to the septin family genes,⁵ which are evolutionarily conserved cytoskeletal GTPases involved in cytokinesis and other cellular processes. The best conserved region is an ATP/GTP binding site (P-loop), called Walker's A box.^{13,14} The expression is detected only in colorectal cancer and malignant melanoma, and not found in other cancers such as stomach cancer and lung cancer. This unique expression profile has never been observed among other mammalian septin family genes.¹ For further analysis of this novel gene, we first tried to overexpress pEGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein; Clontech) *Bradeion*. However, the massive aggregate formation in cytoplasm was observed when EGFP-fused *Bradeion* was expressed, which caused apoptotic cell death until 24 hours after transfection (M Tanaka, unpublished data). These results were not informative to know the further cellular function of *Bradeion* gene, and instead, we decided to disrupt *Bradeion* expression. With the advent of the development of hammerhead ribozymes and its derivatives reported by our institute,^{10,11} the *Bradeion* β mRNA containing a characteristic exon-exon junction can be specifically targeted and cleaved without damaging a related *Bradeion* α mRNA. Based on the results obtained using *ras*-inactivating ribozymes by Kijima et al,⁷ Yamazaki et al,⁸ and Tsuchida et al,⁹ we succeeded in constructing and using *Bradeion* α - and β -specific ribozymes.

The present study demonstrated that the impaired expression of *Bradeion* α and β directly affected cell division. There are wide variances in cell cycle disorders among cell lines, which may be caused by the variation of the inhibition rates in *Bradeion* expression. The specific expression of ribozyme and maxizyme transfected was confirmed in each procedure. More importantly, the persistence of slight *Bradeion* α expression even in double mutants will suggest that *Bradeion* α expression might be essential for the maintenance and proliferation of colorectal

adenocarcinoma cells. It is emphasized that the partial decrease of *Bradeion* expression was enough to cause growth inhibition and arrest in colorectal carcinoma cells.

The data obtained here extend the utility of these tools for target validation in monitoring and controlling colorectal cancer. The genetic variance among individuals indeed prevents many candidate genes from being used as a target for gene therapy.² For example, mutated *p53* were identified among 30–50% of the patients, and the same ratio was observed for *p21* mutations.^{15–17} However, the value of the genes for therapy remains unclear, and further advances in the gene transfer field will likely be required to advance ribozymes as a therapeutic agent.² Indeed, as potential therapeutics, several problems remain to be solved related to delivery, specificity, and expression. We have also been trying to solve this problem using a recombinant adenovirus as a tool for delivery.^{7–9}

Thus, the preset study indicates the possible efficacy of *Bradeion* ribozymes to disrupt cell proliferation and division. A recent report describes that the P-loop structure of septins is closely related to the induction of apoptosis.¹⁸ *Bradeion* also triggers apoptotic processes by overexpression in cancer cell (M Tanaka, unpublished data). More information related to specific killing of cancer cells is being examined to demonstrate the biochemical function and signal transduction mechanisms related to *Bradeion* expression.

It is clear, however, that the data demonstrated here clearly highlight the clinical potential importance of the *Bradeion* gene as a tumor-specific target. Further laboratory and clinical investigations may provide novel strategies for the diagnosis and therapy of colon cancer.

Acknowledgments

The authors thank Akira Togiya (Takara Shuzo, Tokyo) for sequence service; Wu-Bo Li (Life Technologies, Rockville, MD), S Hadano and J-E Ikeda (Tokai University), H Kawasaki (Tokyo University), and Y Nagasaka (Beckman Instruments) for valuable discussions and technical advice; and Kenji Sekikawa (National Institute of Agrobiological Sciences) for critical reading of the manuscript.

References

1. Tanaka M, Tanaka T, Kijima H, et al. Characterization of tissue- and cell type-specific expression of a novel human septin family gene *Bradeion*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;286:547–553.
2. Vile RG, Diaz RM. Gene therapy. In: Spurr NK, Young BD, Bryant SP, eds. *ICRF Handbook of Genome Analysis*. Oxford: Blackwell; 1998:649–666.
3. Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. Requirement for *p53* and *p21* to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*. 1998;282:1497–1501.
4. Tanaka M, Tanaka T, Harata M, Suzuki T, Mitsui Y. Triplet repeat-containing ribosomal protein L14 gene in immortalized human endothelial cell line (t-HUE4). *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;243:531–537.

5. Longtine MS, DeMarini DJ, Valencik ML, et al. The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:106–119.
6. Wood JN, Hudson L, Jessell TM, et al. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Typanosoma cruzi* parasites. *Nature.* 1982;296:34–38.
7. Kijima H, Ishida H, Ohkawa T, et al. Therapeutic applications of ribozymes. *Pharmacol Ther.* 1995;68:247–267.
8. Yamazaki H, Kijima H, Ohnishi Y, et al. Inhibition of tumor growth by ribozyme-mediated suppression of aberrant epidermal growth factor receptor gene expression. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:581–587.
9. Tsuchida T, Kijima H, Hori S, et al. Adenovirus-mediated anti-K-ras ribozyme induces apoptosis and growth suppression of human pancreatic carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2000;7:373–388.
10. Kawasaki K, Eckner R, Yao TS, et al. Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature.* 1998;393:284–289.
11. Kuwabata T, Warashina M, Nakayama A, et al. tRNA^{Val}-heterodimeric maxizymes with high potential as gene inactivating agents: simultaneous cleavage at two sites in HIV-1 Tat mRNA in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;95:1886–1891.
12. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs Wb III, et al. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1976;36:4562–4569.
13. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, et al. Distantly related sequences in the alpha- and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1982;1:945–951.
14. Saraste M, Sibbald PR, Wittinghoger A. The P-loop — a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci.* 1990;15:430–434.
15. Capon DJ, Seeburg PH, McGrath JP, et al. Activation of K-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature.* 1983;304:507–513.
16. Barbacid M. ras gene. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779–827.
17. Bos JL. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Cancer Res.* 1989;49:4682–4689.
18. Larisch S, Yi Y, Lotan R, et al. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol.* 2000;2:915–921.